Jürgen Kayser

BEITRAG ZUR BAKTERIOLOGISCHEN DIAGNOSTIK DER GENITALEN VIBRIONEN-INFEKTION BEIM RIND

MÜNCHEN 1959

Aus der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Schleißheim
Direktor: Professor Dr. H. Schellner

Vorgelegt vom Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

BEITRAG ZUR BAKTERIOLOGISCHEN DIAGNOSTIK DER GENITALEN VIBRIONEN-INFEKTION BEIM RIND.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der
Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Jürgen Bertram Kayser
aus
Berlin-Charlottenburg

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Professor Dr. K. Zipf

Referent : Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion : 28. 7. 59

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

gewidmet

R.U.L.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I. EINLEITUNG

Die genitale Vibrionen-Infektion des Rindes (Vibriosis genitalis) ist eine spezifische Deckinfektion, die sich klinisch im wesentlichen durch Aborte, die in allen Stadien der Trächtigkeit eintreten können, und eine mehr oder weniger vorübergehende Sterilität (Enzootische Sterilität) zu erkennen gibt. Sie ist in fast allen Erdteilen verbreitet und führt zu mitunter beträchtlichen wirtschaftlichen Verlusten.

Die Infektion mit Vibrio fetus kommt gewöhnlich beim Deckakt oder bei der künstlichen Besamung mit infiziertem Sperma von sogenannten Überträgerbullen zustande.

Die Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion erfolgt durch den Nachweis der Erreger in abortierten Feten, Eihäuten, Cervical- bzw. Uterus-Sekret, Präputial-Spülproben und Sperma sowie durch den Nachweis erregerspezifischer Agglutinine im Blutserum und im Cervico-Vaginalsekret der infizierten Tiere. Wird Vibrio fetus bei Einzeltieren oder Herden nachgewiesen, so müssen entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen eingeleitet werden.

Viele Autoren bezweifeln die Einheitlichkeit der Species Vibrio fetus, wie sie von BERGEY (13) angegeben wird (EASTERBROOKS, GOERTTLER, HUBRIG, JUHLER, KIGGINS, PLASTRIDGE, WILLIAMS, WOHANKA u. a.). Werden aus abortierten Feten keine anderen Abortus-Erreger als Vibrio fetus isoliert, so ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß diese Keime die Ursache des Abortes darstellen. Beim Nachweis der Vibrionen in Eihäuten von Aborten erhebt sich jedoch schon die Frage, ob es sich um pathogene oder saprophytäre Vibrionen handelt, da GRÖGEL (50) auch in Eihäuten von Normalgeburten häufig Vibrionen finden konnte. Noch fraglicher wird

der Vibrionen-Nachweis zur Feststellung der Vibriosis, wenn Vibrionen im Genitale männlicher oder weiblicher Rinder ermittelt werden, auch wenn Sterilität und Aborte auftreten. So konnten Vibrio bubulus und Vibrio percolans von Vibrio fetus abgetrennt und als apathogen erkannt werden (FLORENT u. THOUVENOT (35, 159). BRYNER u. FRANK (18) wiesen durch biochemische Prüfung der Vibrionen (Katalase-Aktivitäts-Test, Prüfung der H_2S-Bildung) sowie durch epidemiologische Untersuchungen nach, daß im Genitaltrakt von Rindern verschiedene Vibrionen-Arten vorkommen, die sich biochemisch unterscheiden; katalase-positive Vibrionen werden von ihnen als pathogen (V. fetus), die katalasenegativen Vibrionen dagegen als apathogen betrachtet (V. sp. bovine). HUBRIG u. Mitarbeiter (59, 60) untersuchten aus dem Genitaltrakt männlicher und weiblicher Rinder und aus Abortus-Material isolierte Vibrionen kulturell, biochemisch und serologisch sowie im Tierversuch und stellten dabei fest, daß bei Bullen sehr häufig apathogene Vibrionen und weniger Vibrio fetus, bei weiblichen Rindern dagegen häufig Vibrio fetus und seltener apathogene Vibrionen vorkommen; in abortierten Feten fanden sie nur pathogene Vibrionen, d.h. Vibrio fetus.

Voraussetzung für eine wirksame Bekämpfung der Vibriosis ist eine sichere Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion bei Bullen. Immunologische Untersuchungsmethoden (Muco-Agglutinations-Test) haben zwar für den Nachweis der Vibrio-fetus-Infektion in Rinderbeständen heute ihren Wert bewiesen (BLOM, BOYD u.a.), doch ist es unter den noch herrschenden Bedingungen der künstlichen Besamung unmöglich, den einzelnen Bullen anders als durch den direkten Erreger-Nachweis als Überträgerbullen zu identifizieren oder auszuschließen.

Solange die im Untersuchungsmaterial nachgewiesenen Vibrionen nicht in Reinkultur isoliert und differenziert sind, kann die Vibrio-fetus-Infektion nicht als sicher

festgestellt gelten.

Die Entnahme und Einsendung von Untersuchungsmaterial sind ebenso wie die Methodik des Kultur- und Tierversuches und die der Differenzierung Gegenstand und Problem zahlreicher wissenschaftlicher Abhandlungen geblieben.

Die vorliegende Arbeit soll durch eine Zusammenstellung der bisher in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse sowie auf Grund eigener Untersuchungen einen Beitrag zum Problem der bakteriologischen Diagnostik der Vibrio-fetus-Infektion des Rindes geben.

Die Anregung zu den einzelnen Untersuchungen verdanke ich dem Direktor der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Herrn Professor Dr. H. Schellner.

II. LITERATUR

A. Allgemeines

In der heute allgemein gebräuchlichen Systematik und Nomenklatur von BREED, MURRAY u. HITCHENS (13) ist die Stellung der Vibrionen wie folgt definiert:

Familie	:	Pseudomonaceae
Unterfamilie	:	Spirilleae
Gattung	:	Vibrio
Art	:	Vibrio fetus u. a.
Gattung	:	Spirillum

Die Vibrionen selbst werden definiert als kurze, starre, gebogene Stäbchen, einzeln oder zu Spiralen vereinigt vorkommend und allgemein mittels einer polaren Geißel beweglich. Seltener ist das Vorkommen von zwei bis drei Geißeln. Die Vibrionen wachsen unter mikroaerophilen Verhältnissen und können allmählich an aerobe Verhältnisse adaptiert werden. Gelatine wird nicht verflüssigt, Zucker und mehrwertige Alkohole werden nicht angegriffen, Indol wird nicht gebildet. Vibrio fetus besitzt in frischem Infektionsmaterial sowie in jungen Kulturen Komma- oder Bumerang-Form.

Die Autoren geben 22 verschiedene Arten der Gattung Vibrio an, die durch biochemische Verfahren voneinander differenziert werden können. Darüber hinaus werden von ihnen etwa 80 weitere Arten erwähnt, aber nicht näher beschrieben. -
Gegenüber den Vibrionen werden die Spirillen als Zellen wechselnder Dicke, Länge und Spiralwindung geschildert, die in ihrem Innern Volutin-Granula erkennen lassen. Die an den Enden zugespitzten Zellen bilden entweder lange Spiralen oder Teile einer Windung und sind für gewöhnlich beweglich durch zwei polar angeordnete Geißelbü-

schel mit je 5 - 20 Geißeln. Unter aeroben Verhältnissen und auf gewöhnlichen Nährböden wachsen die Spirillen im allgemeinen gut. Die meisten Arten verflüssigen Gelatine und bilden aus Kohlenhydraten Säure. - Die Spirillen sind immer wesentlich dicker und länger als die Vibrionen, auch erscheinen sie weitaus plumper.

Die Vibrionen erlangten zuerst eine Bedeutung in der Humanmedizin, als ROBERT KOCH 1883 den Vibrio comma als Erreger der Cholera asiatica des Menschen entdeckte.

In der Veterinärmedizin fanden die Vibrionen erstmals Beachtung, als McFADYEAN u. STOCKMAN (89) 1908 in England spirillenförmige Mikroben in abortierten Rinder-Feten fanden, die sie als Ursache der Aborte erkannten. Es gelang ihnen, diese Keime in Reinkultur zu isolieren und durch intravenöse Verimpfung lebender Kulturen bei Rindern experimentell Aborte hervorzurufen. 1913 konnten diese Forscher gleichartige Mikroorganismen auch aus abortierten Schaf-Feten isolieren (89). Sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen und Meerschweinchen, die mit diesen Keimen experimentell infiziert wurden, traten Aborte auf. McFADYEAN u. STOCKMAN betrachteten die von ihnen ermittelten Spirillen als Erreger enzootischer Aborte bei Rindern und Schafen.

SMITH (136) wies 1918 in USA in abortierten Rinder-Feten ebenfalls Spirillen nach und bezeichnete sie 1919 (137) als Vibrio fetus.

In Deutschland wurden spirilläre Mikroben als Ursache infektiösen Abortes beim Rind erstmalig 1920 etwa gleichzeitig von GMINDER (46) und von LERCHE (83) nachgewiesen. SPIEGL (142) stellte diese Keime 1925 in unserem Lande auch in verlammten Früchten beim Schaf fest.

DOBBS u. McINTYRE (27) ermittelten 1951 Vibrio fetus auch in abortierten Ziegen-Feten.

FLORENT (35) isolierte 1953 aus dem Sperma von Bullen und aus dem Vaginalsekret weiblicher Rinder eine Vibrionen-Art, die er als apathogen erkannte; FLORENT führte für sie die Bezeichnung Vibrio bubulus ein.

JONES, ORCUTT u. LITTLE (73) züchteten 1931 einen Keim aus dem Darm von an Dysenterie leidenden Kälbern, den sie Vibrio jejuni benannten und als ätiologischen Faktor für die Black Diarrhea bei Rindern ansahen.

DOYLE (28) bezeichnete die im Darm von Schweinen vorkommenden und Dysenterie verursachenden Vibrionen als Vibrio coli. Von HARMS u. HÖRTER (52) wurden diese Keime Vibrio suis und von ROLLE u. MUNDT (131) Spirillum suis genannt.

B. Spezieller Teil

1. Die in den Genitalorganen von Rindern vorkommenden verschiedenen Vibrionen-Arten.

Nach BREED, MURRAY u. HITCHENS (13) sind alle im Genitalapparat von Rindern vorkommenden Vibrionen und ebenso die aus bovinem Abortus-Material isolierten Vibrionen als Vibrio fetus anzusprechen. Positive kulturelle oder biochemische Verfahren für die Identifizierung von Vibrio fetus werden von den Autoren nicht angegeben.

Die Forschungen von FLORENT (35, 159) haben jedoch ergeben, daß im Genitalapparat der Rinder zumindest zwei verschiedene Vibrionen-Arten vorkommen. FLORENT konnte verschiedene Male aus dem Sperma eines Bullen sowie aus der Vagina von zwei virginellen Färsen, die durch diesen Bullen gedeckt worden waren, atypische Vibrionen isolieren. Er schloß, daß es sich bei diesen Vibrionen um eine apathogene, saprophytische Art handelt, da bei den Versuchstieren keinerlei Symptome feststellbar waren, die auf eine Infektion mit Vibrio fetus hätten deuten können. Auch der Agglutinationstest mit dem Cervico-Vaginalschleim beider Färsen war sowohl bei Verwendung von entsprechendem Antigen wie bei Verwendung von Vibrio fetus-Antigen stets negativ. FLORENT bezeichnete die von ihm als apathogen angesehenen Vibrionen als Vibrio bubulus. Vibrio bubulus wächst in halbflüssigen Nährmedien in Form einer weißlichen, sehr dünnen Scheibe ca. 5 mm unter der Oberfläche des Mediums. Weitere Differenzierungsmerkmale gegenüber Vibrio fetus sind die reichliche H_2S-Bildung, die Beibehaltung der starken Beweglichkeit bei fortlaufender Subkultivierung und das Fehlen der Tendenz, bei fortgesetzter Subkultivierung lange Formen zu bilden. Die Zellen von Vibrio bubulus bleiben stets komma- oder S-förmig. Im übrigen benötigt Vibrio bubulus für das Wachstum eine größere CO_2-Spannung in der umge-

benden Atmosphäre als Vibrio fetus. Eine Überkreuzagglutination zwischen Vibrio fetus und Vibrio bubulus tritt nicht auf.
BRYNER u. FRANK (18) konnten durch biochemische Untersuchung der aus Bullensperma und Vaginalschleim von Rindern isolierten Vibrionen mit Hilfe der Prüfung auf Katalase-Aktivität und auf H_2S-Bildung sowie durch epidemiologische Untersuchungen ebenfalls nachweisen, daß im Genitalapparat vom Rind zwei verschiedene Arten von Vibrionen vorkommen. Die Vibrionen, welche als Ursache für Aborte und Sterilität ermittelt worden waren (V. fetus), erwiesen sich als katalase-aktiv und H_2S-negativ und zeigten kein Tiefenwachstum in Stichkulturen. Jene Vibrionen aber (V. sp. bovine), deren Vorkommen sich weder mit Aborten noch mit Sterilität in Verbindung bringen ließ, waren katalase-negativ und H_2S-positiv und wiesen in Stichkulturen Tiefenwachstum auf. Die Autoren sehen demnach die katalase-aktiven und H_2S-negativen Vibrionen als pathogen, d.h. als Vibrio fetus, die katalase-negativen und H_2S-positiven Vibrionen dagegen als apathogen an. Bei serologischen Untersuchungen ergaben sich keine oder nur geringe wechselseitige Beziehungen der beiden Vibrio-Arten zueinander. Bei Jungbullen und virginellen Färsen konnten katalase-positive Vibrionen nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse von HUBRIG u. WOHANKA (60) stimmten mit denen von BRYNER u. FRANK überein.

Nach Mitteilung von TERPSTRA (156) gibt es pathogene Vibrionen-Stämme, die neben starker Katalase-Aktivität auch das Vermögen besitzen, reichlich H_2S zu bilden. Die experimentelle Übertragung dieser Vibrionen auf Versuchstiere führte zu Aborten und zur Ausbildung von Agglutininen im Vaginalschleim. MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92) erhoben gleichartige Befunde und sind der Ansicht, daß die Bildung von H_2S mithin nicht gegen

die Identifizierung eines Stammes als Vibrio fetus spricht. Ebenso äußerten CHEVÉ u. GAUTHIER (20) Zweifel an dem Wert des H_2S-Nachweises für die Vibrionen-Diagnostik.

LINDQUIST (87) isolierte aus den Genitalien von Rindern verschiedene Vibrionen-Stämme, die sich morphologisch und kulturell nur sehr wenig von Vibrio fetus unterschieden, wohl aber hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (Katalase, H_2S, Tiefenwachstum in Stichkulturen) und ihrer Antigen-Struktur. Gegenüber virginellen Färsen besaßen diese Stämme nicht die starke Infektiosität wie Vibrio fetus.

HUBRIG u. WOHANKA (58, 60) berichten, daß sie aus Feten ausschließlich katalase-positive Vibrionen isolieren konnten, wohingegen in Sperma- und Präputialspülproben sowie in Vaginalschleim zumeist katalase-negative Vibrionen nachgewiesen wurden. Katalase-negative Vibrionen sind nach den Untersuchungen der Autoren nicht bei Aborten beteiligt.

Nach ROSSI (133) läßt sich Vibrio bubulus von Vibrio fetus, abgesehen von der kulturellen und biochemischen Prüfung, bereits durch die direkte phasenkontrastmikroskopische Untersuchung unterscheiden; die meisten anderen Autoren verneinen dies jedoch.
Sowohl THOUVENOT u. FLORENT (159) als auch EASTERBROOKS u. Mitarbeiter (31) isolierten Vibrionen aus dem Sperma von Bullen und dem Vaginalsekret von Kühen, die sie als Vibrio bubulus und Vibrio percolans von Vibrio fetus unterschieden und als apathogen erkannten.

Von VANDEPLASSCHE u. Mitarbeitern (163, 165) sowie von AKKERMANS, TERPSTRA u. van WAVEREN (5) wird außer Vibrio fetus und Vibrio bubulus eine weitere Vibrionen-Art erwähnt und als Typ III bezeichnet. Beide Forschergruppen teilen übereinstimmend die im Genitalapparat von Rindern sowie in bovinem Abortus-Material

ermittelten Vibrionen auf Grund ihrer Pathogenität und ihrer morphologischen, kulturellen, biochemischen und serologischen Eigenschaften in drei Gruppen ein:

Gruppe 1: Pathogene Vibrionen (Vibrio fetus), die aus dem Präputium von Bullen und dem Genitaltrakt weiblicher Rinder isoliert wurden und Sterilität verursachten. Diese Vibrionen sind von spiraliger Gestalt und bilden in Kulturen kurze und lange Formen. In Stichkulturen erfolgt kein Tiefenwachstum. Für das Wachstum ist eine Verminderung des Sauerstoffdruckes um 20 mm Hg und eine Erhöhung der CO_2-Spannung um 10% erforderlich. Vibrio fetus ist katalase-aktiv und H_2S-negativ, ruft in Vaginalschleim die Bildung von Agglutininen hervor und agglutiniert mit positiven Schleimproben.

Gruppe 2: Apathogene Vibrionen (Vibrio bubulus), die in Präputialspülproben und Sperma von Bullen sowie im Vaginalschleim weiblicher Rinder nachgewiesen wurden und deren Vorkommen weder mit Aborten noch mit Sterilität in Verbindung zu bringen war. Diese Vibrionen sind von kommaförmiger Gestalt, die auch in Kulturen beibehalten wird. Für das Wachstum ist eine Verminderung des Sauerstoffdruckes um 40 mm Hg und eine Erhöhung der CO_2-Spannung um 10 % notwendig. Vibrio bubulus ist katalase-negativ und H_2S-positiv und weist in Stichkulturen ein Tiefenwachstum auf. Im Vaginalschleim wird keine Bildung von Agglutininen hervorgerufen, auch kommt es zu keiner Agglutination von Vibrio-fetus-positiven Schleimproben.

Gruppe 3: Diese Vibrionen-Art (Vibrio fetus ?) konnte

nur aus abortierten Feten isoliert werden und wurde nie in Fällen von Sterilität oder bei Bullen nachgewiesen. Ihre Gestalt ist spiralig; in Kulturen treten kurze und lange Formen auf. In Stichkulturen erfolgt kein Tiefenwachstum. Die Vibrionen sind katalase-aktiv und H_2S-negativ, wobei die Katalase-Aktivität nicht immer so stark ausgeprägt ist wie bei Vibrio fetus. Das Wachstum erfolgt gleich gut in einer 10%igen CO_2-Atmosphäre bei normaler wie bei verminderter Sauerstoffspannung. Der Vaginalschleim-Agglutinationstest ist nur mit Antigen aus einem homologen Stamm positiv.

Hinzuzufügen ist, daß Bullen in der Präputialhöhle gleichzeitig pathogene und apathogene Vibrionen beherbergen können.

2. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale von weiblichen Rindern.

a) Lokalisation:

In der Literatur finden sich übereinstimmende Berichte, nach denen katalase-positive Vibrionen bei infizierten Färsen und Kühen, nicht aber bei virginellen Färsen, regelmäßig im Cervico-Vaginalsekret und meist auch im Uterus nachweisbar sind; katalase-negative Vibrionen hingegen wurden nur im Vaginalsekret ermittelt.

Nach BERTHELON u. TOURNUT (9) kommt Vibrio fetus im gesamten Genitaltrakt des weiblichen Rindes vor. ADLER u. Mitarbeiter (4) konnten Vibrionen nur bis zur kaudalen Uterushälfte feststellen. TERPSTRA u. EISMA (157) untersuchten die Genitalorgane von 7 Versuchsfärsen, die von einem mit Vibrio fetus infizierten Bullen gedeckt und 6 bis 94 Tage später geschlachtet worden waren. Es gelang den Autoren hierbei, Vibrio fetus aus

der Vagina und der Cervix aller 7 Färsen sowie aus dem Uterus und/oder der Salpinx von 4 Färsen zu isolieren. Bei der Untersuchung der Genitalorgane wegen Sterilität geschlachteter Kühe auf das Vorkommen von Vibrionen, wozu Proben aus Vagina, Portio vaginalis uteri, Cervix, Uterus und Oviduct sowie aus Blase und Urethra entnommen wurden, konnten FRANK u. BRYNER (42) Vibrio fetus nur in dem von Portio und Uterus entnommenen Material ermitteln. MUNDT (97) wies Vibrio fetus sowohl mikroskopisch als auch kulturell in dem Scheidenvorhof, dem Diverticulum suburethrale, der Cervix, dem rechten Uterushorn und dem zugehörigen Oviduct bei einer fünfjährigen Kuh nach, die 1 1/2 Jahre lang nicht mehr konzipiert und stets umgerindert hatte. VANDEPLASSCHE u. Mitarbeiter (165) erkannten, daß Vibrio fetus bei infizierten Rindern in Vagina und Cervix sowie ab 10. Tag post infectionem regelmäßig im ganzen Uterus und mitunter auch im Oviduct auffindbar ist.

VANDEPLASSCHE (164) berichtete unlängst, daß er Vibrio fetus bei Versuchsfärsen, die am 3. und 4. Tag nach dem infizierenden Deckakt geschlachtet wurden, nur in Vagina und Cervix ermitteln konnte. Bei Färsen, die ab 5. Tag bis 6 Wochen nach der Infektion geschlachtet wurden, gelang es, Vibrio fetus in der Vagina, der Cervix und im Uterus nachzuweisen. Nur bei 4 von 37 untersuchten Färsen konnten die Vibrionen auch im Oviduct gefunden werden. Bei allen 10 Färsen, die ab dem 49. Tag bis zu 8 Monaten nach der Infektion geschlachtet wurden, konnte Vibrio fetus in der Vagina, bei nur 4 dieser Färsen auch in der Cervix und bei keiner Färse im Uterus festgestellt werden. Nach WOHANKA u. HUBRIG (182) gelingt die Isolierung von Vibrio fetus aus dem Cervicalschleim von Versuchsfärsen regelmäßig am 3. Tag nach dem Deckakt mit einem infizierten Bullen oder der künstlichen Besamung mit dem Sperma oder dem Zentrifugat von Präputial-Spülproben

eines infizierten Bullen, oft aber auch schon am 1. Tag.

Vibrio bubulus und Vibrio percolans konnten von EASTERBROOKS u. Mitarbeitern (31) sowie von FLORENT (35) und anderen Autoren nur im Vaginalschleim nachgewiesen werden.

b) Häufigkeit:

Die in der Literatur über die Häufigkeit des bakteriologischen Nachweises von Vibrionen im Genitaltrakt weiblicher Rinder gemachten Angaben ergeben leider kein eindeutiges Bild über die tatsächlichen Verhältnisse, da selbst in den neueren Veröffentlichungen oft der Hinweis fehlt, ob es sich in den betreffenden Fällen um pathogene oder apathogene Vibrionen gehandelt hat. Dennoch sollen hier die Befunde einiger Autoren zitiert werden.

HIGNETT (54) konnte bei der Untersuchung von 180 Rinderherden mit mangelnder Fruchtbarkeit in 48 Fällen Vibrionen ermitteln. Von LAWSON u. McKINNON (80) wird berichtet, daß ihnen der Nachweis von Vibrio fetus im Vaginalsekret bei 42 von 90 virginellen Färsen, die von drei mit Vibrio fetus infizierten Bullen gedeckt worden waren, 10 Tage nach dem Deckakt gelang. ADLER u. Mitarbeiter (4) isolierten aus dem Uterus von 95% der infizierten Rinder Vibrio fetus. MARBACH (88) fand bei der Nachuntersuchung von 19 Rindern, die abortiert hatten, Vibrionen nur in den Portio-Tupferproben von zwei Rindern und in der Vaginal-Schwemmprobe eines weiteren Rindes, wohingegen die Vibrionen in den abortierten Feten 18 mal festgestellt werden konnten. DEDIÉ u. VOIGT (25) ermittelten Vibrionen in 69 von 354 (19%), ohne Rücksicht auf den Vorbericht untersuchten Vaginalsekretproben. BRODAUF(17) konnte in klinisch verdächtigen Beständen bei 11 von 155 untersuchten Kühen im Portioschleim Vibrionen

nachweisen. HUBRIG (58) fand in 100 willkürlich entnommenen Cervicalschleimproben nur einmal Vibrio fetus. HUBRIG u. RÖHR (59) züchteten aus dem Cervical- bzw. Vaginalschleim von 183 Färsen 45 katalase-aktive und 2 katalase-negative und aus gleichartigen Proben von 89 Kühen 8 katalase-aktive Vibrionen-Stämme und 1 katalase-negativen Stamm. Die Untersuchungen von GÖTZ (48) führten bei 28 von 314 Kühen (ca. 9%) und bei 1 von 81 Färsen zur kulturellen Ermittlung von Vibrionen im Vaginalschleim. GRÖGEL (50) konnte aus dem Cervical- bzw. Vaginalschleim von 200 wahllos untersuchten weiblichen Rindern (8 mindestens zweijährige Färsen, 189 nichttragende und 3 ca. sechs Wochen trächtige Kühe) 3 katalase-aktive und 13 katalase-negative Vibrionen-Stämme isolieren. Darüber hinaus wurden in 4 weiteren Proben Vibrionen kulturell nachgewiesen, die jedoch nicht in Reinkultur isoliert und somit nicht differenziert werden konnten.

Nach TERPSTRA u. EISMA (157) sind Vibrionen am häufigsten bei Kühen auffindbar, die zum dritten Male kalben.

3. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale von männlichen Rindern.

a) Lokalisation:

In der Literatur finden sich übereinstimmende Berichte, nach denen das Vorkommen katalase-aktiver wie das katalase-negativer Vibrionen beim Bullen auf die Präputialhöhle und den distalen Teil der Harnröhre beschränkt ist. Pathogene und apathogene Vibrionen können im Genitale eines Bullen gleichzeitig auftreten. Bei Jungbullen konnten allerdings keine pathogenen Vibrionen (V. fetus) nachgewiesen werden (BRYNER u. FRANK (18)).

Von TERPSTRA u. EISMA (157) sowie von NAGEL (103)

wurden Vibrionen sowohl in Präputialspülflüssigkeit als auch im Sperma vibrionen-infizierter Bullen festgestellt. RASBECH (116) versuchte die Lokalisation der Vibrionen im Urogenitaltrakt des Bullen zu ermitteln und bediente sich hierbei virgineller Färsen, auf die er experimentell Organproben übertrug, welche von der Präputialschleimhaut, der Glans penis, den Samenblasen, den Hoden und den Nebenhoden sowie aus den Nieren, der Harnblase und dem Harn mehrerer vibrio-fetus-infizierter Bullen entnommen worden waren. RASBECH schloß aus den Versuchsergebnissen, daß Vibrio fetus sich beim Bullen vorzugsweise auf der Präputialschleimhaut ansiedelt. Die Möglichkeit, daß Vibrio fetus auch in den Harnorganen vorkommt, wird offen gelassen. BEER (8) fand bei einem mit Vibrio fetus infizierten Bullen Vibrionen ebenfalls nur im Präputium und nicht in den Hoden, den Samenblasen, der Prostata und der Harnröhre.

Bei der Untersuchung eines infizierten Deckbullen, in dessen Präputialspülproben vorher keine Vibrionen nachweisbar waren, konnte EHRLICH (32) nach der Schlachtung des Tieres Vibrionen in der Präputialhöhle und zwar im Bereich der S-förmigen Krümmung des Penis mikroskopisch einwandfrei feststellen; es ist nicht angegeben, ob diese Vibrionen differenziert wurden. FRANK u. BRYNER (42) untersuchten die Hoden, Nebenhoden, Samenleiter, Ampulle, Samenblasen, Urethra und Fornix einiger mit Vibrio fetus infizierter Bullen kulturell, wobei ihnen die Isolierung von Vibrio fetus stets nur aus dem Präputial-Material glückte. MUNDT (97) konnte bei einem infizierten, dreijährigen Bullen Vibrio fetus aus folgenden Abschnitten des Genitalapparates kultivieren: Galea glandis, Collum glandis, Corpus penis, Krypten des Penis, Umschlagblatt des Präputiums und vorderer Teil der Harnröhre (bis etwa 30 cm entfernt vom Orific. urethrae ext.). Am reichlichsten wurden die Vibrionen

von der Umschlagstelle des Präputiums isoliert. Bei der Untersuchung im Phasenkontrast-Mikroskop wurden in den Nativpräparaten von Galea glandis, Collum glandis, Corpus penis und Harnröhre nur vereinzelt, in den Präparaten von der Umschlagstelle des Präputiums jedoch in größerer Menge Vibrionen ermittelt. In Hoden, Samenblasen, Prostata, Harnblase, oberem Abschnitt der Harnröhre sowie in Duodenum, Kot, Blut, Milz und Nieren wurden keine Vibrionen entdeckt.

PRÖGER (115) berichtet über Vibrionen-Funde im Präputium von Jungbullen, die noch nie gedeckt hatten. Er vermutet, daß es sich hierbei um apathogene Vibrionen handelte. GÖTZ (48) wies Vibrionen in Präputialspülproben von einjährigen Jungbullen nach, konnte diese Mikroorganismen aber nicht bei 4 bis 10 Monate alten Bullen entdekken. Untersuchungen an Schlachtrindern ergaben weiterhin, daß Vibrionen häufig im Präputium von Ochsen vorkommen (42% der Fälle). Sowohl die bei den Jungbullen als auch die bei den Ochsen isolierten Vibrionen wurden als apathogen angesehen.

b) Häufigkeit :

In der Literatur sind zwar eine Reihe von Angaben über die Häufigkeit der Vibrionen-Funde im Genitalapparat männlicher Rinder gemacht worden, doch lassen sie meist ebenso wenig wie die entsprechenden Angaben für weibliche Rinder auf die tatsächlichen Verhältnisse schliessen, da auch hier oftmals ein Hinweis auf die Pathogenität der ermittelten Vibrionen fehlt. - In neueren Veröffentlichungen wird allgemein berichtet, daß im Genitale von Bullen sehr häufig apathogene Vibrionen vorkommen.

DEDIE u. VOIGT (25) untersuchten die Bullen aus drei Besamungs-Stationen und ermittelten dabei in jeder dieser Stationen Bullen, die mit Vibrio fetus infiziert waren.

MARBACH (88) fand Vibrionen im Sperma bei 3 von 6 untersuchten Bullen. BRODAUF (17) konnte bei 10 von 17 Deckbullen, die aus klinisch verdächtigen Beständen stammten, Vibrionen im Präputialsekret feststellen. Weder MARBACH noch BRODAUF berichten über die Differenzierung der von ihnen isolierten Vibrionen. PRÖGER (115) wies Vibrionen bei 12 von 24 untersuchten Deckbullen im Vorsekret und bei 2 weiteren Bullen im Sperma nach und vermutet, daß es sich bei diesen Vibrionen um apathogene Arten handelte, da die betreffenden Bullen in keiner Weise infektionsverdächtig waren. Von MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92) wurden aus Präputialspülproben bzw. aus Sperma von Bullen 18 Vibrionen-Stämme isoliert; bei der Differenzierung erwiesen sich 14 Stämme als katalase-aktiv (V. fetus) und 4 als katalase-negativ. WOHANKA (180) berichtet, daß er Vibrionen bei 17 von 24 Besamungsbullen im Präputium fand; bei 9 der 17 vibrio-positiven Bullen konnte er den Befund gleichzeitig aus Präputialsekret und Sperma erheben. Nach neueren Untersuchungen von WOHANKA (181) waren bei fast allen Besamungsbullen Vibrionen nachweisbar. Bei der Differenzierung dieser Vibrionen ergab sich, daß 30% der untersuchten Bullen mit Vibrio fetus infiziert waren. Auch HOPPE (57) gibt die Verseuchung von Deckbullen durch Vibrio fetus mit 30% an. HUBRIG (58) kultivierte 26 Vibrionen-Stämme aus Präputialspülproben und aus Sperma von Bullen, wobei die Kultivierung dieser Mikroorganismen 9 mal aus Präputialsekret und Sperma gleichzeitig, 12 mal aus Präputialsekret und 5 mal aus Sperma allein gelang.

HUBRIG, WOHANKA u. GRÄNZ (62) untersuchten Präputialspülproben und Sperma-Proben, die in unregelmäßigem, oft aber wöchentlichem Abstand während einer dreimonatigen Periode von 19 Bullen (2 Deck- und 17 Besamungsbullen) entnommen wurden. Bei 7 dieser Bullen (2 Deck- und 5 Besamungsbullen) wurden pathogene und bei

14 Bullen (Besamungsbullen) apathogene Vibrionen nachgewiesen. Die gleichzeitige Feststellung pathogener und apathogener Vibrionen konnte bei 3 der insgesamt 18 vibriopositiven Bullen gemacht werden.
HUBRIG u. RÖHR (59) isolierten aus 598 Bullenspül- und Sperma-Proben 55 katalase-positive und 181 katalase-negative Vibrionen-Stämme, wobei 26 mal die gleichzeitige Ermittlung beider Vibrionen-Arten gelang.
GÖTZ (48) entdeckte Vibrionen im Präputium bei 8 von 19 Schlachtochsen (42%) sowie bei 3 von 28 Jungbullen (ca. 11%). Er untersuchte ferner die Präputialsekretproben von 53 Bullen sowie das Sperma von 9 dieser Tiere und fand Vibrionen 18 mal im Präputialsekret, 2 mal gleichzeitig im Präputialsekret und im Sperma und 1 mal im Sperma allein, also bei insgesamt 21 Bullen (ca. 40%). Die Untersuchung der Präputialspülproben von weiteren 57 Bullen aus 4 Besamungs-Stationen sowie der Spermaproben von 43 dieser Tiere führte zum Nachweis von Vibrionen bei 30 Bullen(ca. 53%), und zwar 27 mal in der Präputialspülprobe und 3mal sowohl in der Präputialspülprobe als auch im Sperma. Im Rahmen aller Untersuchungen konnten nur 7 Vibrionen-Stämme in Reinkultur erhalten werden, von denen 6 Stämme als apathogen und 1 Stamm als pathogen differenziert wurden.
VANDEPLASSCHE (163) berichtete 1955, daß in USA auf den Besamungs-Stationen 17% der Bullen mit Vibrionen behaftet seien. In Dänemark waren nach einer Mitteilung von RASBECH (117) von 800 Bullen 23% mit Vibrio fetus infiziert.

4. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen in bovinem Abortus-Material.

a) Lokalisation:

In den diesbezüglichen Veröffentlichungen wird angegeben, daß nach dem Abortus bei infizierten Rindern die Vibrionen fast immer in den Plazenten sowie im Mageninhalt der Feten nachweisbar waren. Sowohl bei den aus Plazenten als auch bei den aus Feten isolierten Vibrionen handelte es sich nahezu stets um katalase-positive, also pathogene Stämme. Lediglich in drei Arbeiten wird über die Kultivierung je eines apathogenen Stammes berichtet. MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92) züchteten einmal aus einem abortierten Fetus einen Vibrionen-Stamm, den sie mittels biochemischer und serologischer Methoden als apathogen differenzierten; dieser Befund ist nach Ansicht der Untersucher rein zufällig. WEIKL (175) ermittelte unter 103 Vibrionen-Stämmen, die aus Abortus-Material kultiviert wurden, nur 1 apathogenen Stamm. Auch GRÖGEL (50) konnte unter einer größeren Zahl von aus Abortus-Material kultivierten Vibrionen-Stämme nur 1 Stamm als apathogen differenzieren.

An dieser Stelle sollen nur einige Autoren zitiert werden, welche Vibrionen außer in Plazenten sowie fetalen Mageninhalten auch in anderen Organen der abortierten Feten fanden.

SMITH (137) sah Vibrionen in Plazenten und fetalen Lungen; er berichtet, daß diese Keime zuweilen auch in den anderen Organen des Fetus angetroffen werden konnten. Von THOMSEN (158) wurden spirilläre Mikroben bei abortierten Feten nur im Labmagen und in der Lunge, von WITTE (179) daneben auch im Darminhalt sowie in den Cotyledonen festgestellt. LERCHE (83) ermittelte die "Spirillen" im Magen-Darm-Inhalt, in der Lunge, dem Herzblut und der Placenta. STEGENGA (143) gelang die

Kultivierung von Vibrionen aus Placenta und Fruchtwasser sowie aus Mageninhalt, Dickdarm, Leber, Lunge, Nieren und Milz der abortierten Frucht. Nach HIGNETT (54) sind vibrio-positive Befunde bei Abortus-Material am ehesten aus Mageninhalt und Fruchtwasser zu erheben. Von LAWSON u. McKINNON (79) wird mitgeteilt, daß die Isolierung der Vibrionen mit Lungen- und Milz-Suspensionen sowie aus dem Mageninhalt am häufigsten bei Feten erfolgte, die im 5., 6. oder 7. Monat der Trächtigkeit abortiert worden waren. Bei in Fäulnis übergegangenen Früchten konnten die Vibrionen noch aus dem Gehirn gezüchtet werden. PRIER (114) gewann Vibrionen-Kulturen aus Placenta und Fruchtwasser und ferner aus dem Mageninhalt der Frucht. FRANK u. BRYNER (42) kultivierten die Vibrionen aus Placenten sowie aus Lunge, Leber, Milz, Nieren und Magen- und Darm-Inhalt der Feten. Von BERTHELON u. TOURNUT (9) wurden die Keime in Placenten und weiterhin in dem Verdauungstrakt, den Atemwegen, der Leber, den Nieren und im Blut der abgegangenen Früchte angetroffen. Neben Placenta und Fruchtwasser wird von EHRLICH (32) vor allem der Mageninhalt als Fundort bezeichnet. DEDIÉ u. VOIGT (25, 169) berichten, daß die Vibrionen in abortierten Feten septikämisch verbreitet sind. Die Autoren isolierten diese Keime unmittelbar aus Labmageninhalt und Bauchhöhlenflüssigkeit sowie aus Leber, Milz, Nieren, Lunge, Herz und Gehirn und ferner aus der Placenta. Bei Feten, die in Fäulnis übergegangen oder durch Hunde, Katzen oder Ratten ausgehöhlt worden waren, konnten die Vibrionen noch im Gehirn kulturell nachgewiesen werden.

b) Häufigkeit:

In einem Bestand, in dem gehäufte Aborte auftraten, stellte SMITH (137) während einer Zeit von 1 1/2 Jahren 27 mal Brucella abortus und 14 mal Vibrionen als Abortus-

Ursache fest. SMITH u. TAYLOR (140) ermittelten bei 109 untersuchten Abortus-Fällen 62 mal Brucellen, 26 mal Vibrionen (ca. 24%) und 2 mal Bact. pyogenes. Von THOMSEN (158) wurden Spirillen in ca. 6 % der von sporadischen Aborten stammenden Nachgeburtsteile entdeckt. WITTE (179) fand bei der Untersuchung von 27 verworfenen Früchten 11 mal Brucellen, 5 mal Spirillen, 1 mal Pseudotuberkulose-Bakterien und 1 mal Salmonellen. LERCHE (84) untersuchte im Verlauf von 4 Jahren 640 abortierte Feten, bei denen er in 370 Fällen Brucellen und in weiteren 11 Fällen "Spirillen" feststellte. OLSON (106) berichtet, daß in Schweden von 1924 bis 1943 in 2105 abortierten Feten Vibrionen nachgewiesen wurden, und zwar bei 10 % der insgesamt untersuchten Abgänge. Die vibrio-positiven Feten waren zu 7 % im 4. Monat, 16 % im 5. Monat, je 28 % im 6. und 7. Monat, 15 % im 8. und 5 % im 9. Monat der Trächtigkeit ausgestoßen worden. Nach Aborten bei Rindern, die mit Brucella abortus Stamm 19 beimpft worden waren, erhoben WILSON u. McDIARMID (178) vibrio-positive Befunde mikroskopisch und kulturell in 7 von 23 Fällen aus Cotyledonen sowie aus fetalem Mageninhalt. Bei 3 Feten konnten aus dem Mageninhalt virulente Brucellen isoliert werden. Die durch Vibrionen bedingten Aborte traten im 4. bis 8. Trächtigkeitsmonat auf. MOORE (93) ermittelte Vibrio fetus in 8 von 9 abortierten Feten, die aus einer Herde stammten. Nach LAWSON u. McKINNON (79) stieg der relative Anteil der Vibrio-fetus-Funde bei den untersuchten Feten in England während der Jahre 1947 bis 1951 von 2,1 % auf 11,6 %; der Brucellen-Nachweis ging in der gleichen Zeit von 18,4 % auf 13,8 % zurück. In diesen 5 Jahren wurde von den Autoren in 112 von 1302 untersuchten Abgängen Vibrio fetus nachgewiesen. (=8,6%). Die Vibrionen kamen am häufigsten in den Fällen vor, in welchen der Abort während des 5., 6. oder 7. Monates der Trächtigkeit erfolgte, fanden sich

aber auch in Feten aller anderen Altersstufen. In Abortus-Material stellte Van ULSEN (161) in Holland 138 mal Br. abortus, 15 mal hämolytische Streptokokken, 12 mal Ps. aeruginosa, 9 mal Vibrio fetus, 8 mal Trichomonas fetus, 2 mal E. coli und je 1 mal Staphylokokken, S. enteritidis und Listerien fest. KAWASHIMA, IWATA u.SUZUKI (74, 75) berichten, daß in Japan während der Jahre 1936 bis 1953 Vibrio fetus bei 143 von 561 untersuchten Feten als Abortus-Ursache ermittelt wurde (ca. 26 %). In den Bezirken von Hyogo und Kyoto waren etwa 25 % aller abortierten Feten im Kulturversuch Vibrio-fetus-positiv. GAUTHIER u. CHEVÉ (45) fanden Vibrio fetus in 37 von 41 Abortus-Fällen, von denen 28 mal Fetus und Placenta sowie 11 mal der Fetus und 2 mal die Placenta allein zur Untersuchung vorlagen. Die mikroskopische Feststellung der Vibrionen gelang 10 mal in der Placenta, 4 mal im Mageninhalt der Frucht und 3 mal gleichzeitig in beiden Proben. Von den 41 Kühen, die abortiert hatten, waren 27 serologisch bangpositiv. CHEVÉ u. GAUTHIER (20) isolierten aus 100 abortierten Feten 69 Vibrionen-Stämme. PRÖGER (115) züchtete Vibrionen aus 6 von 11 abortierten Feten, die aus 5 Gemeinden mit Fruchtbarkeitsstörungen stammten. BEER (8) teilt mit, daß er Vibrio fetus bei 10,5 % aller untersuchten Feten (152) nachweisen konnte. Von DEDIÉ u. Voigt (25) wurden bei der Untersuchung von 43 Feten und 15 Placenten Vibrionen in 23 und 2 Fällen ermittelt. WOHANKA (180) kultivierte Vibrio fetus aus 27 von 61 dem Kulturversuch unterzogenen Feten bzw. Placenten. HUBRIG u. WOHANKA (60) gewannen aus dem Labmageninhalt abortierter Feten 40 Vibrio-fetus-positive Kulturen. HUBRIG u.RÖHR (59) isolierten aus dem Material von 85 Abortus-Fällen (Feten und Placenten) 66 Vibrio-fetus-Stämme.

Aufschlußreiche Angaben macht WEIKL (175) in seiner Veröffentlichung über die Feststellung von Vibrionen im Einzugsgebiet der Bayerischen Landesanstalt für Tier-

seuchenbekämpfung. Bei der mikroskopischen Untersuchung von 2100 Feten und Secundinae wurden in 103 Fällen (= 4,9 %) Vibrionen nachgewiesen. Später konnten durch Einschaltung eines Kultur-, genauer eines Anreicherungs-Verfahrens Vibrionen besonders auch bei solchen Frühaborten ermittelt werden, die bakterioskopisch völlig negativ waren. Auf diese Weise wurden z. B. in 12 von 45 mikroskopisch negativen Proben doch noch Vibrionen festgestellt. Der Autor schließt aus seinen Untersuchungsergebnissen, daß die durch Vibrio fetus bedingten Aborte in allen Stadien der Trächtigkeit eintreten können, wenngleich auch die Vibrionen-Aborte in den ersten vier Monaten der Trächtigkeit prozentual wesentlich häufiger zu erfolgen scheinen als in der zweiten Hälfte derselben. Bei 240 Frühverwerfensfällen wurden 37 mal Vibrionen nachgewiesen (= 15,4 %), wohingegen bei 1760 Spätverwerfensfällen nur 63 mal Vibrionen festgestellt werden konnten.

Einmal wurden Vibrionen noch aus einem in der 36. Woche abortierten Fetus gezüchtet. Da mit einer Ausnahme alle vom Verfasser aus Feten und Placenten isolierten Vibrionen auf Grund ihrer Katalase-Aktivität und der fehlenden H_2S-Bildung als Vibrio fetus identifiziert wurden, sieht dieser es als sehr wahrscheinlich an, daß es sich auch bei den bisher nur mikroskopisch ermittelten Vibrionen um die pathogene Art gehandelt hat. In diesem Zusammenhang wird die Meinung vertreten, daß apathogene Vibrionen-Arten, z. B. als nachträgliche Verunreinigung aus dem Stallmilieu, in Feten und Placenten nur sehr selten vorkommen.

GRÖGEL (50) wies in 45 von 167 Placenten, die von im 5. bis 9. Trächtigkeitsmonat erfolgten Aborten stammten, kulturell Vibrionen nach (= 27 %), und zwar 12 mal neben Brucellen, je 3 mal neben Schimmelpilzen und Ps. aeruginosa sowie 5 mal neben Kokken und E. coli. Aus

57 abortierten Feten wurden in 12 Fällen Vibrionen gezüchtet (=21%), wobei je 1 mal Brucellen und Schimmelpilze und 2 mal Kokken und E. coli gleichzeitig festgestellt wurden. In 51 Fällen konnten Fetus und Placenta untersucht werden, wobei der kulturelle Nachweis von Vibrionen in 27 Fällen gelang (=53%), und zwar 14 mal gleichzeitig aus Placenta und Fetus, 9 mal nur aus dem Fetus sowie 4 mal nur aus der Placenta. In den vibrio-positiven Proben wurden je 2 mal Brucellen, Schimmelpilze, Tuberkel-Bakterien und Kokken gleichzeitig angetroffen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in 84 von 275 untersuchten Abortus-Fällen (Feten und Placenten) Vibrionen kulturell nachweisbar waren (=30,6%). In den 84 positiven Proben kamen ferner 14 mal Br. abortus, 6 mal Schimmelpilze, 3 mal Ps. aeruginosa, 9 mal Kokken und E. coli sowie 2 mal Tb-Bakterien vor.

Von GRÖGEL (50) wird auch über Vibrionen-Funde in Placenten, die von zeitlich normal eingetretenen Geburten stammten, berichtet. Der Autor konnte aus 12 von 25 solcher Nachgeburten, die keine pathologisch-anatomischen Veränderungen aufwiesen, Vibrionen züchten. In 3 Fällen wurden gleichzeitig Brucellen ermittelt. Nur ein Vibrionen-Stamm konnte in Reinkultur isoliert werden; er war katalase-positiv und H_2S-negativ.

5. Gewinnung und Verarbeitung von Untersuchungsmaterial zum mikroskopischen und kulturellen Nachweis der Vibrionen. +)

a) Material von weiblichen Rindern:

Der kulturelle Vibrionen-Nachweis in verunreinigtem Untersuchungsmaterial ist wohl möglich, doch ist die Reinkultur dieser Keime aus solchem Material durch das Wachstum von Begleitkeimen, vor allem von Proteus- und Pseudomonas-Arten, außerordentlich erschwert, oft sogar unmöglich. Deshalb wurden verschiedene Instrumente und Verfahren für eine möglichst gezielte Probenentnahme beim weiblichen Rind entwickelt, um mit deren Hilfe ein an Verunreinigungskeimen armes Material gewinnen zu können.

In der Literatur wird allgemein mitgeteilt, daß der kulturelle Nachweis von Vibrionen beim weiblichen Rinde am sichersten aus dem Sekret gelingt, das aus dem Cervical-Kanal oder aus der Umgebung der Portio vaginalis uteri zur Zeit der Brunst entnommen wurde (42, 162, 32, 31, 79, 152). RISTIC u. Mitarbeiter (127) kultivierten Vibrio fetus aus Vaginalschleim während des 1. Östrus nach dem Abort, einmal auch noch 68 Tage nach dem Abort. Auf der 1954 von der FAO++) veranstalteten Tagung über die Unfruchtbarkeit des Rindes (152) wurde als Standard-

---

+) Einzelheiten über Art und Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien sind in Abschnitt 9e - i aufgeführt.

++) Food and Agricultural Organisation der Vereinten Nationen (UN).

Methode die Proben-Entnahme mittels der von den Holländern entwickelten Vaginal-Pipette empfohlen. Diese Pipette besteht aus einem einfachen Glasrohr von 50 cm Länge und 1 cm Durchmesser, das 10 cm von dem einen Ende in einem Winkel von etwa 30 Grad abgebogen ist. Die Proben sollen zur Zeit der Brunst entnommen und so bald wie möglich verarbeitet werden.

Zur Gewinnung von Sekret bzw. Schleimhaut aus dem Uterus verwendet ADLER (2) das von Volmar NIELSEN entwickelte Biopsie-Instrument. Zwei solcher Biopsie-Instrumente werden in eine 30 cm lange und 14 mm weite Metallröhre eingelegt, in deren Ende ein Gaze-Tampon steckt. Der Tampon ist mit einem Faden versehen, dessen Ende aus der hinteren Öffnung der Röhre heraushängt. Zur Proben-Entnahme wird die sterile Apparatur in die Vagina bis zur Cervix eingeführt. Nachdem der Tampon herausgestossen wurde, wird das eine Instrument unter rektaler Kontrolle in die äußere Öffnung des Cervix-Kanals geschoben, geöffnet, mit Schleim gefüllt, geschlossen und entfernt. Das zweite Instrument wird sodann in den Uterus eingeführt, geöffnet, unter manuellem Druck per rectum mit Material gefüllt, geschlossen und zurückgezogen. Nach Wunsch kann der Tampon für 20 Minuten in der Vagina belassen werden und später für den Muco-Agglutinationstest Verwendung finden. Die Instrumente werden so schnell wie möglich in das Labor gebracht, wo das gesammelte Material auf ein halbfestes Nährmedium verimpft wird, welches sodann bis zu 10 Tagen bei 37° C in einer 10 - 20%igen CO_2-Atmosphäre bebrütet wird.
Die Cervix-Tupferprobe wird nach der Tampon-Methode von JEPSEN u. VINDEKILDE gewonnen, wie sie von SZABO (151) beschrieben, bzw. von MERKT u. GARNICA (91) sowie von PLASTRIDGE u. Mitarbeitern (109, 29) in etwas modifizierter Form publiziert wurde. HUGHES (65) entnimmt die Schleimproben nach einem Verfahren, das den vorstehend angeführten Methoden im Prinzip gleicht. Zunächst

werden Vulva und Umgebung gründlich gereinigt und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Dann werden die Vulvalippen mit der einen Hand weit auseinandergezogen und mit der anderen Hand wird ein Spekulum, in dem ein an einer Schnur befestigter Gaze-Tampon liegt, bis in Cervix-Nähe eingeführt. Der Tampon wird mittels eines Stabes aus dem Spekulum herausgeschoben und bleibt nach Entfernung desselben 20 Minuten in situ, um eine ausreichende Probe zu erhalten. Anschließend erfolgt die Entnahme des Tampons mittels der Schnur. Schnur mit Tampon werden in einem sterilen Gefäß baldmöglichst in das Labor gebracht und weiter verarbeitet. Diese Methode ist wohl exakt, arbeitet jedoch langsam und erfordert maximal sterile Arbeitsweise. Deshalb ist HUGHES (65) davon abgekommen, die Tampon-Methode für den kulturellen Nachweis der Vibrionen zu verwenden und gewinnt Proben solchermaßen nur noch für den Muco-Agglutinationstest. Material für die kulturelle Untersuchung entnimmt er mittels einer 36 cm langen und 1cm weiten Glaspipette, die an der einen Seite mit einem Gummisauger versehen ist. Pro Probe werden mehrere Röhrchen angezüchtet, die halbfestes Thiol-Medium (0,5% Agar) enthalten und bei 37° C in einer 10 - 20%-igen CO_2-Atmosphäre bebrütet werden.

TERPSTRA u. EISMA (157, 154) gewinnen Material für die serologische Untersuchung mittels der Tampon-Methode und für die kulturelle Untersuchung mittels der von ihnen entwickelten sog. Vaginal-Pipette, bei dieser Pipette handelt es sich um ein einfaches Glasrohr von 50 cm Länge und 1 cm Durchmesser, das 10 cm vor einem Ende leicht abgebogen ist. Am anderen Ende befindet sich ein Gummischlauch mit einem Mundstück. Zur Proben-Entnahme wird die Vulva gereinigt und dann die Pipette mit dem gebogenen Teil voran bis zur Cervix eingeführt. Durch Vor- und Rückwärtsbewegen sowie durch kreisende Bewegung mit der Pipette

kann der Schleim gelöst und durch Saugen in derselben leicht gesammelt werden. Nach dem Zurückziehen der Pipette wird diese durch Gummistopfen verschlossen und ohne Abkühlung möglichst schnell ins Labor gebracht. Dort wird der Schleim mit einer Nadel auf Rinderblut-agar-Platten, die vorher sorgfältig getrocknet worden sind, ausgestrichen und 3 bis 4 Tage lang in einer 10%igen-CO_2-Atmosphäre bei 37°C bebrütet. Der Schleim wird vorzugsweise während der Brunst und aus der Nähe der Portio entnommen. LAWSON u. McKINNON (80, 81) sammeln den Schleim ebenfalls zur Zeit der Brunst aus Cervix-Nähe mit einer gleichen Pipette, wie die eben beschriebene. Die besten kulturellen Ergebnisse wurden 7 bis 21 Tage nach der Infektion durch den Deckakt oder die Insemination erhalten. Zur Anzüchtung werden pro Probe mehrere Blutagar-Platten mit je 1 - 2 ml Schleim beimpft und wie üblich bebrütet. Von MORGAN (95) wird Schleim aus der Cervix mit einer sterilen Kanüle, mit Besamungspipetten auch aus dem Uterus gewonnen.

FRANK u. BRYNER (41, 40) entnehmen Vaginalschleim und Uterussekret mit Hilfe eines von ihnen konstruierten Instrumentes, das aus zwei ineinander passenden, verschiebbaren Röhren besteht. In der Mitte der inneren Röhre liegt ein Stahlstab, an dessen Vorderende ein Wattebausch befestigt ist. Über das herausstehende Ende des Stabes wird ein Gummischlauch mit einem Mundstück gebracht und mit der kleinen Röhre verbunden. Über dem vorderen Ende der großen Röhre wird eine Gummi-Membran befestigt. Zur Proben-Entnahme wird die Vulva gereinigt und dann das zusammengesetzte Gerät unter rektaler Kontrolle bis fast an die Cervix herangeschoben. Ein Helfer drückt die innere Röhre vorwärts und zerreißt dadurch die Gummi-Membran am Ende der größeren Röhre. Auf diese Weise wird die innere Röhre, in die nunmehr das

Untersuchungsmaterial gesaugt wird, frei von Verunreinigungen der anderen Teile des Genitaltraktes direkt an die Entnahme-Stelle gebracht. Ist der Schleim gesammelt und die innere Röhre wieder in die äußere zurückgezogen, wird das Gerät entfernt. Im allgemeinen werden bei Kühen kurz vor der Brunst 5 - 6 ml Schleim gewonnen. Durch Vorschieben des Stabes mit dem Wattebausch kann auch aus dem Uterus Sekret entnommen werden. Ehe die eigentliche Sammel-Röhre aus der äußeren Röhre herausgezogen wird, erfolgt die Sterilisation der letzteren über der Flamme. Nachdem auch das Ende der inneren Röhre leicht abgebrannt wurde, drückt man die Schleimprobe mittels des an dem Stab befestigten Wattebausches aus dieser heraus. Von jeder Probe werden mittels eines Spatels je 0,1 - 0,5 ml Schleim auf 2 - 3 Blutagar-Platten verteilt. Die Uterus-Tupfer werden entweder direkt auf Blutagar-Platten ausgestrichen oder in Nähr-Bouillon ausgewaschen, die dann als Ausgangskultur für weitere Verimpfungen dient. Die Bebrütung der beimpften Platten erfolgt in einem auf 430 mm Hg evakuierten und anschließend mit 10 Vol. % CO_2 gefüllten Desiccator für 3 bis 5 Tage bei 37°C. Bebrütete Platten werden zunächst mit einem Stereo-Mikroskop bei 13-facher Vergrößerung untersucht.
Zur Entnahme von Vaginalschleim, vor allem bei Färsen, verwendet FLORENT (36) eine Kürette, die die Form eines Löffels mit einem stumpfen Ende hat. Nach Reinigung der Vagina und des Vestibulums mit einem in Alkohol getränkten Tupfer wird durch Schaben mit der Kürette etwas Schleim gewonnen. Von den solchermaßen sauber entnommenen Proben werden jeweils mehrere frische Schrägagar-Röhrchen, besonders das Kondenswasser derselben, mit je einem Schleimtropfen beimpft.

STEGER (145) entwickelte die Vaginal-Ausschwemm-Technik. Röhrchen von 18 cm Länge und 18 mm Weite,

wie sie gewöhnlich zur Einsendung von Einzelmilchproben verwendet werden, füllt man etwa zur Hälfte mit physiologischer NaCl-Lösung. Nach Reinigung der Vulva-Region wird das geöffnete Röhrchen langsam in die Vagina eingeführt und an seinem Ende leicht angehoben, wodurch die Kochsalz-Lösung in die Scheidenhöhle einfließt. Durch mehrere kräftige, stoßartig und rasch geführte Bewegungen des an seinem Ende gehaltenen Röhrchens wird die Kochsalz-Lösung über die Schleimhaut der Vagina geschwemmt und der vorhandene Schleim gelöst. Durch Senken und langsames Zurückziehen des Röhrchens wird infolge des im Vaginalraum herrschenden Unterdruckes die Kochsalz-Lösung und der in ihr gelöste Schleim zurückgewonnen. Die Probe wird alsbald ins Labor gebracht, geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wird für den Muco-Agglutinationstest, der Bodensatz für den Kulturversuch verwendet. Bei Rindern mit Pneumovagina oder mangelhaftem Schluß der Schamlippen versagt diese Methode der Proben-Entnahme, da es infolge fehlenden Unterdruckes in der Vagina nicht gelingt, die Spülflüssigkeit auf einfache Weise zurück zu gewinnen. GÖTZ (48) bezeichnete die Steger' sche Technik der Proben-Entnahme für den kulturellen Vibrionen-Nachweis als ungeeignet, wenngleich sie sich für die Gewinnung von Proben für den Muco-Agglutinationstest bestens bewährt hat. Nach VOIGT (169, 170, 171) muß die Proben-Entnahme so stattfinden, daß die größtmögliche Konzentration der Vibrionen in der Probe gewährleistet ist, wobei das Vitalitäts-Optimum dieser Keime im sauerstoffarmen Milieu zu berücksichtigen ist. Lebensfähige Vibrionen müssen demnach in der Tiefe der Genitalschleimhäute und nicht in oberflächlich stagnierenden Sekreten vermutet werden. Das Infektionsgeschehen läßt ferner erkennen, daß die Vibrionen gleichzeitig mit der Absonderung von frischen, im Stadium der Produktion befindlichen Sekreten (Brunstschleim, Präputialsekret) aus der Tiefe der

Mukosa ausgeschieden werden. Deshalb eignen sich diese unwillkürlichen Sekrete sehr gut für den Kulturversuch. Zur willkürlichen Auslösung der Sekretproduktion bedient sich der Autor der Cervical-Tampon-Methode nach MERKT u. GARNICA (91) mit der Abänderung, daß ein an einem Faden befestigter taubeneigroßer Tampon in den Kanal der bis zur Schamspalte hervorgezogenen Cervix einige Zentimeter tief eingezwängt wird. Hierbei ist darauf zu achten, daß der Tampon keine anderen Teile des Genitaltraktes berührt. Durch den Druck des relativ großen Tampons auf die Cervicalschleimhaut wird eine reaktive Schleimproduktion provoziert und der Tampon von diesem Sekret in statu producendi durchtränkt. Nach 15 Minuten hat der Tampon eine ausreichende Menge des abgesonderten Sekretes aufgesogen und wird unter Spreizung der Schamlippen durch Zug am Faden entfernt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß das Sekret für die kulturelle Untersuchung jederzeit und nicht nur während der Brunst gewonnen werden kann; sie ist nach Mitteilung des Autors den anderen Methoden weit überlegen. Nach der Entnahme müssen die Tampons bzw. Sekrete sofort und möglichst steril in flüssige oder halbfeste Nährmedien sowie auf Blutagar-Platten gebracht werden, da die empfindlichen Vibrionen einen längeren Transport in angetrocknetem Zustand nicht vertragen, zumindest aber in dieser Form dem Antagonismus ubiquitärer Saprophyten oder fakultativ pathogener Sekundärkeime, mit denen in fast allen Fällen zu rechnen ist, nicht widerstehen würden. Die Blutagar-Platten werden mikroaerophil bei 2 mm Hg und 10-15% CO_2 3 Tage lang, die Leber-Leberbouillon und der Leberbouillonagar dagegen aerob bebrütet. Die Leber-Leberbouillon-Kulturen werden schon nach eintägiger Bebrütung mikroskopisch mit Hilfe des Phasenkontrast-Verfahrens bei einer Vergrößerung von 1 : 400 und dann täglich bis zum 6. Tag untersucht. Die Blutagar- und Leberbouillonagar-Kulturen werden nach acht-

tägiger Bebrütung auf das Wachstum von Vibrionen geprüft.

Von BRODAUF (14, 15) wurde ein einfaches Gerät für die Gewinnung von Schleim aus dem Genitale des weiblichen Rindes entwickelt, das aus einem starren Katheter mit angeschraubtem Saugkopf am Vorderende besteht, in dem ein kleiner Tupfer liegt. Am Hinterende des Katheters ist ein Schlauch befestigt, der an eine 100ml-Spritze angesetzt wird. Mit Hilfe dieser Spritze kann der Vaginal-Schleim in den Saugkopf des Gerätes gesogen werden, wo der Tupfer das abgesaugte Sekret aufnimmt.

DEDIE u. VOIGT (25) entnehmen Brunstschleim mittels eines Katheters oder Tupfers. Die gesammelten Proben werden anschließend sofort in sterile Gläser mit oder ohne Nährmedium gebracht. Die Absaug-Methode nach BRODAUF wird ebenfalls verwendet. Cervical-Schleim wird nach dem von VOIGT publizierten Verfahren gewonnen. Von Uterus- und Vaginal-Sekretproben werden zunächst Nativ-Präparate im Phasenkontrast-Mikroskop bei 400facher Vergrößerung geprüft. Die Proben sollen zur Untersuchung nicht älter als 24 Stunden sein.

b) Material von Bullen :

Als Untersuchungsmaterial für den mikroskopischen, vor allem aber den kulturellen Nachweis von Vibrionen beim Bullen sind in der Literatur Präputial-Spülflüssigkeit, Vorsekret und Sperma genannt. Für die Gewinnung von Präputial-Spülproben sind verschiedene Entnahme- und Verarbeitungs-Methoden entwickelt und publiziert worden, wogegen für die Gewinnung von Sperma einheitlich die künstliche Vagina in der üblichen Weise verwendet wird. Einige Autoren übertragen das Sperma und mitunter auch Präputial-Material auf virginelle Färsen oder kleine Versuchstiere

(hierüber siehe Abschnitt 6, Seite 42 ff), doch hat sich im allgemeinen die schon bei der Trichomonaden-Diagnostik bewährte mehr und mehr durchgesetzt.

SJOLLEMA (135) teilte mit, daß ihm der Nachweis von Vibrio fetus bei infizierten Bullen durch den Kulturversuch nicht immer sicher gelang. Auch LEVI u. Mitarbeiter (85) und MORGAN (95) brachten zum Ausdruck, daß die bakteriologische Untersuchung des Spermas und der Präputial-Spülflüssigkeit auf Vibrio fetus zu keiner sicher verläßlichen Diagnose der Infektion führte.

In der letzten Zeit wurden jedoch verschiedene Verfahren für die Proben-Entnahme und -Verarbeitung sowie geeignete Nähr- und Selektiv-Medien entwickelt, mittels derer die bakteriologische Diagnostik der Vibrionen-Infektion beim Bullen bedeutend verbessert wurde.

Nach FLORENT u. VANDEPLASSCHE (39) sowie nach HUGHES (66) ist die kulturelle Untersuchung des Materials von Bullen auf Vibrio fetus einfacher, billiger und weniger zeitraubend als der Färsen-Versuch; sie erreicht auch in den Händen dieser Autoren die gleiche Zuverlässigkeit. Auch auf dem Kongreß der FAO über die Unfruchtbarkeit beim Rind (152) wurde festgestellt, daß eine definitive Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion beim Bullen durch die Kultivierung von Sperma und Präputial-Spülflüssigkeit möglich ist. TERPSTRA u. EISMA (157) gewinnen Untersuchungsmaterial aus dem Präputium des Bullen mittels eines hydrophilen Gaze-Tupfers, der am Ende eines Kupferstabes befestigt ist. Dieser Stab mit dem Tupfer wird, geschützt durch eine an ihrem Ende verschließbare Metallröhre, in die Präputialhöhle eingeführt. Liegt die Röhre mit ihrem Vorderende an der vorgesehenen Entnahmestelle, so wird sie geöffnet und der Tupfer mit dem Stab vorgeschoben und vor- und rückwärts bewegt, wodurch die Gaze mit der Schleimhaut von Präputium und Penis

in Berührung kommt. Dann wird der Stab in die Röhre zurückgezogen, diese wieder geschlossen und aus der Präputialhöhle entfernt. Sofort anschließend wird der feuchte Gaze-Tupfer in Nährbouillon ausgeschüttelt, die dann für Kultur- und Isolierungsversuche Verwendung findet. Die Kultivierung von Sperma führte hinsichtlich der Isolierung von Vibrionen zu befriedigenderen Resultaten als die Kultivierung von Präputial-Spülflüssigkeit.

Von FRANK u. BRYNER (41) wird Präputial-Material mit dem von BARTLETT für die Trichomonas-foetus-Untersuchung beschriebenen Instrument oder mit dem Instrument entnommen, das von ihnen selbst für die Proben-Entnahme bei Kühen entwickelt wurde (siehe S. 28). Das gesammelte Material wird aus dem Instrument bzw. dem Tupfer mit 6 ml physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen und entweder direkt auf feste Nährmedien kultiviert oder zunächst mit der gleichen Menge Nährbouillon versetzt. Ein Tropfen der Waschflüssigkeit oder der beimpften Bouillon wird auf der Oberfläche einer Blutagar-Platte ausgestrichen und von dort durch serienweise Verdünnung auf 3 weitere Blutagar-Platten verteilt (fraktionierte Überimpfung). Mit dem Material jeder Probe werden 4 solcher Plattenserien mit je 4 Platten, insgesamt also 16 Platten, beimpft. Sperma wird mit Hilfe einer sterilen künstlichen Vagina gewonnen und kultiviert, indem 1 Tropfen in gleicher Weise wie das Präputial-Material fraktioniert auf 4 Blutagar-Platten ausgestrichen wird, 2 - 3 solcher Plattenserien erhöhen die Sicherheit des Vibrionen-Nachweises. Nach Angabe der Autoren konnte Vibrio fetus durch die Kultivierung von Sperma besser isoliert werden als durch die von Präputial-Material.

Allgemein wird zur Spülung der Präputialhöhle physiologische NaCl-Lösung empfohlen. Von MERKT u. GARNICA (90) wurde dagegen die Nährbouillon nach

FRITZSCHE als geeignetstes Spülmedium bezeichnet (1000 ml Rindfleischwasser, 10 g Pepton, 3 g NaCl, 2 g Na_2HPO_4, 20 g Traubenzucker; pH 7,5; vor der Zuckerzugabe 30 Minuten im Dampftopf sterilisieren und nachher nochmals auf etwa 80°C erhitzen). Die Autoren stellten fest, daß dies Spülmedium etwa vorhandenen Keimen, insbesondere Vibrio fetus, ein besseres Milieu bietet als physiologische NaCl-Lösung. Die Verwendung der Nährbouillon als Präputial-Spülflüssigkeit setzt allerdings größte Sauberkeit und Exaktheit bei der Proben-Entnahme und schnellstmöglichen Transport in einem Kühlbehälter voraus, da sonst leicht Verunreinigungskeime (Proteus- und Subtilis-Mesentericus-Keime) die Bouillon überwuchern und eine genaue Diagnose unmöglich machen können. BRODAUF (14, 15, 16) entwickelte die Absaug-Methode. Das Besondere dieser Methode liegt darin, daß das Sekret der Präputialhöhle unverdünnt abgesaugt wird. Das zu diesem Zweck konstruierte Gerät besteht aus einem Schlauchkatheter, der vorn einen metallenen, vielfach durchlöcherten Saugkopf trägt. Zwischen dem wirksamen Saugmechanismus und dem Entnahmekatheter befindet sich ein Glaszwischenstück, das an einem Stutzen mit Schliff ein Sekretsammelkölbchen trägt. Der Gummikatheter ist so lang gehalten, daß der bis in den obersten Teil der Präputialhöhle vorgeschoben werden kann. Da sich der Penis durch den Saugreiz reflektorisch retrahiert, kann mit dem anfangs weit vorgeschobenen Saugkopf durch langsames Zurückziehen desselben Sekret aus allen Abschnitten des Präputiums, die sich unter dem entstehenden Vakuum um den Saugkopf legen, entnommen werden. Der Saugkopf kann auch einen Tupfer aufnehmen, so daß das Sekret darin und nicht in dem Sammelkölbchen aufgefangen wird. Die bei der Spülprobe erforderliche geschlechtliche Reizung des Bullen vor der Proben-Entnahme ist bei der Saug-Methode überflüssig, da der Sog selbst einen starken Reiz darstellt.

Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, daß das abgesaugte Sekret steril entnommen und aufgefangen wird. Der Sog wird mit Hilfe einer 100ml-Spritze erzeugt. Der Autor hat den ursprünglich empfohlenen Vergaser-Sog vom Automobil aus sowie die Verwendung der Wasserstrahlpumpe wieder aufgegeben. BRODAUF (16) beobachtete, daß vibrio-fetus-infizierte Bullen im Vergleich zu nicht infizierten Bullen eine bedeutend verstärkte Sekretion aufweisen.

Auch VOIGT (169, 171) bedient sich des BRODAUFschen Absaug-Gerätes für die Gewinnung von Präputialsekret. Ferner sammelt er Material von infektionsverdächtigen Bullen, die mindestens 3 Tage vom Deck- bzw. Besamungsbetrieb ausgeschlossen waren, nach geschlechtlicher Reizung mit Hilfe eines Tupfers. Die entnommenen Proben werden sofort in Leber-Leberbouillon angezüchtet. DEDIÉ u. VOIGT (25) streichen das von geschlechtlich gereizten Bullen produzierte Vorsekret oder das nach BRODAUF gewonnene Präputialsekret sofort an Ort und Stelle auf festen Nährmedien (Platten) aus. Nach ihren neueren Erfahrungen überwuchern unspezifische Keime in flüssigen und halbfesten Nährmedien sowie beim Transport in Spülflüssigkeit eher als auf festen Nährmedien. Von den ins Institut eingesandten Tupfer-, Sekret- und Spülproben werden zunächst Nativpräparate angefertigt und im Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. WOHANKA (180) kultiviert Vorsekret, Sperma und Präputial-Spülproben.

Von den meisten Autoren wird besonders auf die Bedeutung hingewiesen, die einer gründlichen Reinigung der Präputial-Öffnung und ihrer Umgebung für eine saubere Proben-Entnahme und damit eine exakte Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion beim Bullen zukommt. HUBRIG, WOHANKA u. GRÄNZ (62) dagegen betrachten alle Bemühungen, durch besondere Maßnahmen (Kürzen der

Pinselhaare, Waschen der Präputial-Öffnung, sterile Gummihandschuhe usw.) oder durch besonders konstruierte, oft komplizierte Instrumente Verunreinigungen durch banale Keime von der Spülflüssigkeit fernzuhalten, als unwirksam. Die Präputial-Schleimhaut der Bullen wird bei Deckakt, Onanie und gelegentlichen Erektionen mit saprophytären Keimen von der Präputial-Öffnung, dem Unterbauch, der Schamgegend der bedeckten Rinder, der Streu und der Stalluft her häufig beschmutzt, so daß bei jeder Art der Entnahme, auch wenn besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen wurden, banale Keime in den Proben vorhanden sein müssen. Das ergaben auch die Untersuchungen dieser Autoren, die deshalb auf besondere Reinigungsmaßnahmen verzichten und sich lediglich bemühen, das sterilisierte Entnahme-Instrument gleich korrekt in die Präputialhöhle einzuführen. Das Instrument besteht aus einem Breslau-Katheter, der durch einen 10 cm langen Schlauch mit einer 100 ml fassenden Janet-Spritze verbunden ist. Zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial werden 50 ml physiologische NaCl-Lösung in die Präputialhöhle injiziert und intensiv gegen ihr blindes Ende zu massiert, wobei auch mehrmals die dort liegende Penisspitze abgestreift wird. Sodann wird die Spülflüssigkeit in die Spritze zurückgesaugt. Die Proben werden stets im Anschluß an Absamungen in künstliche Vaginae genommen. Im allgemeinen züchteten HUBRIG und seine Mitarbeiter die Proben bereits 2 bis 3 Stunden nach der Entnahme im Labor an; sie konnten jedoch experimentell nachweisen, daß Vibrio fetus auch eine 24-stündige Aufbewahrung in der Spülflüssigkeit verträgt, wobei Aufbewahrungstemperaturen zwischen + 2,5° C und + 30° C ohne wesentlichen Einfluß auf die Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit der Vibrionen zu sein schienen. Ein geringfügig besseres Wachstum konnte allerdings erzielt werden, wenn die Aufbewahrungstemperatur für die Spülflüssigkeit zwischen + 2,5° C und

+ 7,5° C gelegen hat. Ein Warmhalten der Proben ist daher auf dem Transport während der Wintermonate nicht erforderlich. Von jeder Spülprobe werden 2 Zentrifugen-Röhrchen mit etwa 15 ml Inhalt 10 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert, worauf sich ein dicker, aus Schmutz und Bakterien bestehender Bodensatz bildet, der verworfen wird. Der Überstand wird in neue Röhrchen umgefüllt und nochmals 30 Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert. Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß sich Vibrio fetus dann stets in zwei Zonen der Flüssigkeitssäule konzentriert finden läßt, nämlich etwa 1,5 cm unterhalb des Flüssigkeitsspiegels und etwa 1,5 cm über dem Boden des Röhrchens. Zur bakteriologischen Untersuchung wird die Flüssigkeit im Röhrchen bis zur 2. Zone abpipettiert und dann reichlich Material aus dieser Zone auf Blutagar-Platten verteilt (pro Probe werden 3 Platten angezüchtet). Das Überimpfen muß möglichst rasch erfolgen, da sich die schnell beweglichen Keime sonst wieder in der Flüssigkeit verteilen. Vergleichende Untersuchungen des aus der 1. Zone und aus dem Bodensatz stammenden Materials erbrachten eine geringere Zahl positiver Befunde. Nach einer 3-tägigen Bebrütung bei 37° C in einer 20%igen CO_2-Atmosphäre werden die Platten mittels eines Auflicht-Mikroskopes auf das Vorkommen von Vibrionen-Kolonien untersucht. Mit Hilfe dieser Methode erhielten die Autoren relativ saubere Vibrio-fetus-Kulturen mit einer dichten Keimaussaat, falls die Kulturen nicht durch Proteus vulgaris oder Pseudomonas aeruginosa überwuchert wurden.

FLATLA u. Mitarbeiter (34) konnten Vibrio fetus aus dem Sperma infizierter Bullen auch noch dann isolieren, wenn es 6 Tage lang bei + 4° C gelagert worden war.

c) Abortus-Material:

Die meisten Autoren teilen in ihren Publikationen mit, daß für den Nachweis von Vibrionen der Mageninhalt der abortierten Feten und die Cotyledonen der zugehörigen Secundinae am besten geeignet sind. Allgemein wird betont, daß die Feten in möglichst frischem Zustand untersucht werden müssen, da andernfalls der Vibrionen-Nachweis nur bedingt sicher ist (VANDEPLASSCHE (163), HIGNETT (54) u. a.). Das Abortus-Material wird gleichermaßen mikroskopisch und kulturell untersucht.

GAUTHIER u. CHEVÉ (45) weisen darauf hin, daß für den Nachweis von Vibrionen die Untersuchung der Secundinae, und zwar der Chorionzotten, weit wichtiger als die des Fetus ist, weil sich die Vibrio-fetus-Infektion zuerst an den fetalen Eihäuten festsetzt, worauf dann der Fetus sekundär befallen werden kann, aber durchaus nicht immer wird. Deshalb erscheint diesen Autoren die kulturelle Untersuchung der Chorionzotten vom praktischen Standpunkt gesehen ausreichend. Proben des Untersuchungsmaterials werden in zwei halbflüssigen Nährmedien angezüchtet, die aus Rinderherzbouillon mit 0,1 % Agar und verschiedenen Zusätzen bestehen. Pro Probe werden 6 Röhrchen-Kulturen angelegt, da die Autoren wiederholt feststellten, daß Vibrionen nur in 1 von 5 beimpften Röhrchen nachweisbar waren. Die erste Kontrolle der angelegten und bei 37° C in einer 10%igen CO_2-Atmosphäre bebrüteten Kulturen erfolgt frühestens nach 48 und spätestens nach 72 Stunden, die zweite Kontrolle nach 7 Tagen. Vom Untersuchungsmaterial werden gleichzeitig nach VAGO (siehe S. 64) gefärbte Ausstriche mikroskopisch geprüft. Hierdurch konnten nach Angabe der Autoren jedoch nur 25 % der kulturell vibrio-positiven Fälle ermittelt werden. Auch TRILENKO (160) und YAKIMOFF (183) erachten die Untersuchung der Secundinae als ausreichend.

LERCHE (84) stellte dagegen fest, daß die Vibrionen in positiven Fällen im fetalen Magen- und Darminhalt meist in großer Zahl vorkamen, wohingegen diese Keime in den Secundinae nur vereinzelt, im Mageninhalt gleichzeitig jedoch zahlreich nachweisbar waren. STEGENGA (143) berichtete ebenfalls, daß die Feten in positiven Fällen in der Regel Vibrionen beherbergen.

EASTERBROOKS u. Mitarbeiter (31) bezeichnen den Mageninhalt als am geeignetsten für den Nachweis der Vibrionen. Der Mageninhalt der Feten wird von FRANK u. BRYNER (42) auf Blutagar-Platten, von CZARNOWSKI (21) auf Leberagar-Platten und von BEER (8) auf Fortner-Platten und Serumagar verimpft. Die Kulturen werden 3 bis 4 Tage lang bei 37° C unter erhöhter CO_2-Spannung bebrütet. TERPSTRA (154) streicht den Inhalt des fetalen Verdauungstraktes auf 10%ige Rinderblutagar-Platten aus, die vorher sorgfältig getrocknet worden sind, und bebrütet sie mindestens 4 Tage lang bei 37° C in einer 10%igen CO_2-Atmosphäre. Zur direkten mikroskopischen Ermittlung der Vibrionen werden Ausstrich-Präparate mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt. VAN RENDSBURG (120) untersucht ebenfalls den fetalen Mageninhalt kulturell; ferner prüft er vom Mageninhalt und von der Magenschleimhaut angefertigte und nach HANSEN u. KÖSTER gefärbte Abklatsch-Präparate mikroskopisch. Von STEPKOWSKI (147) wird darauf hingewiesen, daß die mikroskopische Untersuchung des Mageninhaltes möglichst frühzeitig erfolgen muß, da derselbe, obwohl er vorher zahlreiche Vibrionen enthielt, bereits 48 Stunden nach dem Abort mikroskopisch negativ sein kann. Nach DEAS (22) sind die Vibrionen am besten mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung von mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbten Objektträgerausstrichen in den Cotyledonen und im fetalen Mageninhalt nachweisbar. Nach Ansicht dieses Autors sind die Vibrionen gegen den Transport des Un-

tersuchungsmaterials sehr empfindlich. HIGNETT (54) richtet sein Augenmerk, soweit möglich, vor allem auf das Fruchtwasser und betont, daß Vibrionen nur in ganz frisch abortierten Feten ermittelt werden konnten. EASTERBROOKS u. Mitarbeiter (31) fanden Vibrionen auch in mumifizierten Feten.

LAWSON u. McKINNON (81) mahlen Teile von Lunge und Milz sowie Mageninhalt (Pansen und Haube) mit sterilem Sand und Salz. Bei angefaulten, angefressenen oder stark verunreinigten Feten wird auch das Gehirn mit gutem Erfolg so verarbeitet. Die Feten sollen jedoch so frisch wie möglich sein. Das vorbereitete Material wird getrennt auf 10%igen Rinderblutagar-Platten und gleichem Schrägagar angezüchtet. Anschließend werden den Schrägagar-Röhrchen jeweils 2 ml defibriniertes Rinderblut zugefügt. Die Bebrütung der Kulturen erfolgt 3 - 6 Tage lang bei 37°C in einer 10%igen CO_2-Atmosphäre. Danach wird das auf den Nährmedien aufgetretene Kolonie-Wachstum mit Hilfe eines schwachen Sektions-Mikroskopes untersucht. Direkte, nach GRAM gefärbte Ausstrich-Präparate werden mikroskopisch geprüft und gleichzeitig angefertigte Nativ-Präparate im Dunkelfeld auf bewegliche Keime durchgesehen. Besondere Aufmerksamkeit wird der Flüssigkeit in den Schrägagar-Röhrchen gewidmet.

VOIGT (169) empfiehlt, zur Untersuchung folgende Teile der abortierten Feten einzusenden: den abgebundenen Labmagen, eine Niere, einen Leberhauptlappen, die Milz, das Herz, eine Lungenhälfte und bei fortgeschrittener Fäulnis auch den Kopf (zum Kulturversuch mit Gehirn-Material). Die Proben sollen das Laboratorium so schnell wie möglich erreichen, da Vibrionen nur in frischem Material sicher nachweisbar sind (168). Dieses wird auf Traubenzucker-Blutagar-Platten und in Leber-Leberbouillon angezüchtet und 3 bis 5 Tage lang bei 37°C und 15 % CO_2 bebrütet.

GRÖGEL (50) entnahm zur kulturellen Untersuchung Material von jeweils mehreren Cotyledonen und vom Mageninhalt sowie Amnion-Flüssigkeit, wenn die Fruchtblasen nicht eröffnet waren. Bei in der ersten Hälfte der Trächtigkeit abortierten Feten untersuchte der Autor den Bauchhöhleninhalt. In jedem Fall wird möglichst viel Material verimpft, und zwar in halbfestes Thiol-Medium mit 0,4 % Agar-Gehalt. Gleichzeitig werden mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbte Objektträger-Präparate mikroskopisch durchgesehen.

HUBRIG (58) übertrug einige Ösen voll Material von Labmageninhalt, Bauchhöhlenflüssigkeit, Lebergewebe usw. auf 15 %igen Blutagar, wobei er jeweils 1 Öse über 5 Platten ausstrich, um dadurch eine Verdünnung des Materials zu erhalten und auf diese Weise Vibrionen-Einzelkolonien darstellen zu können. Das entsprechende Material wurde gleichzeitig in je 2 Röhrchen mit Leber-Leberbouillon (0,1 % Agar-Gehalt) verimpft.

6. Nachweis der Vibrio-fetus-Infektion mit Hilfe von Färsen und kleinen Versuchstieren.

a) Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen mit Hilfe von Versuchs-Färsen:

Im Gegensatz zu FLORENT u. VANDEPLASSCHE (39), HUGHES (66) und anderen halten SJOLLEMA (135), FLATLA u. Mitarbeiter (34), KOSLAK (76) und einige weitere Autoren zur Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen den indirekten Erreger-Nachweis auf dem Umweg über Prüf-Färsen für erforderlich, um eine sichere Diagnose stellen zu können, da nach ihrer Ansicht das direkte kulturelle Nachweis-Verfahren schwierig und unsicher ist.

ADLER u. Mitarbeiter (3) untersuchten die diagnosti-

Rindern für die praktische Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen. Hierbei besamten sie vibrio-negative Färsen mit dem Sperma infektionsverdächtiger Bullen und entnahmen am 30. und 50. Tag nach der Besamung den Cervical-Schleim dieser Färsen zur serologischen Prüfung. Die Untersucher schlossen aus ihren Versuchsergebnissen folgendes: 1. nicht immer gelingt der Nachweis von Vibrio fetus durch den Infektions-Versuch an weiblichen Rindern, da u.a. nicht alle Tiere für eine eventuelle Infektion gleichmäßig empfänglich sind; 2. für dieses Nachweis-Verfahren sind nur virginelle Färsen geeignet; 3. die Ermittlung infizierter Bullen mit einer Ansteckungs-Intensität von 30 - 50 % ist nur dann ausreichend sicher, wenn jeweils 6 bis 10 Färsen mit dem Sperma eines verdächtigen Bullen besamt werden; 4. kurz vor der Besamung müssen Cervical-Tamponproben entnommen und zur Kontrolle serologisch untersucht werden; 5. in positiven Fällen tritt ein ausreichend sicherer Agglutinations-Titer nur bei Proben in Erscheinung, die 30 bis 50 Tage nach der Besamung entnommen werden. ADLER (2) teilte später mit, daß er von jedem verdächtigen Bullen 2 - 3 Ejakulate sammelt und anschließend die Präputialhöhle mit 200 ml physiologischer NaCl-Lösung (pH 7, 5) ausspült. Die Proben werden so bald wie möglich im Laboratorium 15 Minuten lang bei 3000 U/min. zentrifugiert. Etwa 2 ml der gemischten Zentrifugate werden mittels Glas-Pipette in den Cervical-Kanal einer Versuchs-Färse gebracht, die serologisch und kulturell vibrio-negativ ist. Kontroll-Untersuchungen werden zweimal vorgenommen, und zwar zuerst 3 - 4 Tage und dann unmittelbar vor der Besamung. 2 - 4 Tage nach der Besamung und dann in Zeitabständen von 3 - 4 Tagen werden Proben bioptisch aus dem Cervical-Kanal und dem Uterus für die kulturelle Untersuchung entnommen. Falls sich bei den ersten 4 Biopsien ein negativer Befund ergibt, wird die Färse wieder zur Untersuchung frischen Materials verwendet. Vorher werden dann wieder Proben bei der

Enucleation des Corpus luteum und unmittelbar vor der erneuten Besamung zur Untersuchung entnommen, so daß sich die negative Diagnose bei einem Bullen auf 6 solcher Teste innerhalb von 3 Wochen gründet. RASBECH (118) bringt Sperma und/oder Präputial-Spülflüssigkeit verdächtiger Bullen in den Uterus virgineller Färsen und weist die Vibrionen, soweit sie im Sperma bzw. in der Präputial-Spülflüssigkeit vorhanden waren, kulturell nach.

PLASTRIDGE u. Mitarbeiter (109, 110) konnten Vibrionen aus allen cervical infizierten Tieren reisolieren, doch nur aus 50 % der vaginal infizierten Tiere. VOIGT (168) verwendet zur Ermittlung eines verdächtigen Bullen 5 - 6 virginelle Färsen, die durch den Bullen gedeckt oder mit seinem Sperma besamt werden. Den in positiven Fällen umrindernden Färsen wird Cervical-Schleim entnommen und dieser kulturell untersucht.

ADLER (2) erhielt bei 100 Uterus-Biopsien, die am 2. - 5. Tag nach der Infektion der Versuchs-Färsen gezogen wurden, 58 % vibrio-positive Resultate. Bei 53 von 89 infizierten Färsen (= 56,6 %) konnte er Vibrionen nachweisen.

FLORENT u. VANDEPLASSCHE (39) isolierten Vibrionen bei 14 von 18 Färsen (= 77 %), die durch Sperma und Präputial-Spülflüssigkeit infiziert worden waren, und zwar am 15. Tage nach der Infektion aus dem exenterierten Uterus.

Im Gegensatz zu ADLER und zu FLORENT u. VANDEPLASSCHE berichten HUBRIG, WOHANKA u. GRÄNZ (62), daß sie mit Hilfe des Färsen-Versuches bezüglich der Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen ausgezeichnete Resultate erhielten. Es gelang den Autoren, bei allen 18 virginellen Färsen, von denen 5 durch infizierte Bullen gedeckt und 13 mit je 1 ml originärem Sperma infizierter Bullen besamt worden waren, Vibrio fetus am 3. Tag nach dem Deckakt bzw. der Besamung

kulturell nachzuweisen. Schon 16 - 24 Stunden nach der Infektion konnten Vibrionen aus dem Vaginal-Schleim der Färsen gezüchtet werden, doch war die bakteriologische Untersuchung sehr erschwert, denn in den Scheiden der Versuchstiere fand sich nach dieser Zeit eine ebenso bunte Flora wie im Präputium der Bullen. Wurden jedoch Cervical-Schleimproben mittels der BRODAUFschen Absaug-Methode am 3. Tag nach der Probe-Paarung bzw. -Besamung entnommen und die Tupfer auf Blutagar-Platten ausgestrichen, so konnte in positiven Fällen Vibrio fetus in Reinkultur oder mit nur geringer Begleitflora isoliert werden. In negativen Fällen blieben die Platten steril oder sie wiesen nur ein geringes Wachstum unspezifischer Keime auf. Proteus vulgaris und Pseudomonas aeruginosa konnten selbst in den Fällen, in denen die mit Präputial-Material direkt beimpften Blutagar-Platten von diesen Keimen überwuchert wurden, am 3. Tage im Vaginal-Schleim nicht nachgewiesen werden, wenn natürlich brünstigen Färsen 1 ml originäres Sperma und 50 ml Präputial-Spülflüssigkeit der betreffenden Bullen intracervical und intrauterin injiziert worden war. Die Autoren wiesen nach, daß ihre Untersuchungs-Methode auch bei negativem Resultat verläßlich ist. Sie halten den nach ihrer Methode durchgeführten Färsen-Versuch, der bereits nach 6 Tagen zu einer sicheren Diagnose am fortlebenden Tier führt, dem Kulturversuch mit Präputial-Material für eindeutig überlegen. Die bakteriologische Untersuchung der Genitalorgane geschlachteter Versuchs-Färsen führte erst nach 15 Tagen zu einer Diagnose. HUBRIG u. Mitarbeiter betonen, daß die Anwendung der Versuchs-Färsen noch so lange notwendig ist, bis optimale Selektiv-Nährmedien für die Kultivierung von Vibrio fetus bekannt sind, die gleich gute Resultate wie die Tierversuche ergeben. MORGAN (95) äußerte sich unlängst in gleicher Weise. Nach BERTHELON u. TOURNUT (9) ist die intracervicale Applikation virulenten Materials an Färsen

eine sichere Methode, die es erlaubt, Vibrio fetus vom 4. Tage nach der Infektion im Bereich des Gebärmutterhalses in Reinkultur wiederzufinden.

b) Brauchbarkeit kleiner Versuchstiere zum Nachweis von Vibrio fetus:

Da die kulturelle Isolierung von Vibrio fetus aus Untersuchungsmaterial schwierig und der Färsen-Versuch umständlich und vor allem kostspielig ist, war man bestrebt, den Tierversuch mit kleinen Versuchstieren zur Verbesserung der Diagnostik heranzuziehen.

Weiße Mäuse sind nach den Untersuchungen von LERCHE (84) und OLSON (106) für eine Infektion mit Vibrio fetus unempfänglich.

Männliche Meerschweinchen können nach IWATA und Mitarbeitern (69) mit Vibrio fetus intratesticulär infiziert werden; die Vibrionen halten sich dann längere Zeit in den Hoden.

Nichtträchtige Meerschweinchen konnten von IWATA und Mitarbeitern (69) durch intraperitoneale, intravenöse und subcutane Injektion von Vibrio-fetus-Kulturen nicht infiziert werden. MUNDT (98) verabreichte nichtträchtigen Meerschweinchen Vibrio-fetus-Kultursuspension auf intraperitonealem, intravenösem, subcutanem, intravaginalem und peroralem Wege. Auf eine Erkrankung hindeutende Symptome traten bei diesen Tieren nicht auf. Vibrionen waren nur bei den intravenös infizierten Tieren nachweisbar, und zwar in der Milz, aber nur bis zum 3. Tage (max. 6. Tag) post injectionem. Diese Tatsache ist bisher von keinem anderen Autor bestätigt worden. RISTIC u. MORSE (124) verimpften je 1 ml Vibrio-fetus-Kultur-Suspension an 4 alternierenden Tagen an nichtträchtige Meerschweinchen auf intraperitonealem, subcutanem, intravaginalem und peroralem Wege, konnten

aber in keinem Falle bei den nach 30 Tagen getöteten Versuchstieren Vibrionen wiederfinden.

Nach ADLER (1) und POWER (112) können nichtträchtige Meerschweinchen durch intravaginale Instillation von Vibrio fetus infiziert werden, wenn sie zuvor durch intramusculäre Injektion von 250 I.U. Progynon B 3 Tage vor und am Tage der Infektion künstlich in den Brunstzustand versetzt werden. Werden die Tiere 5 - 6 Tage post infectionem getötet, so lassen sich in ihrem Uterus in etwa 50 % der Fälle Vibrionen nachweisen. ADLER (1) machte sich diese Tatsache für die Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen zunutze, indem er künstlich in den Brunstzustand versetzten Meerschweinchen Sperma und Präputial-Material infektionsverdächtiger Bullen intravaginal applizier Fünf bis 6 Tage später werden die Versuchstiere getötet und ihre Uteri unter aseptischen Kautelen jeweils in 5 Teile zerschnitten. Diese Uterus-Stückchen werden in ein halbflüssiges Nährsubstrat verbracht, das dann 10 Tage lang bei 37°C in einer 10 - 20 % CO_2-haltigen Atmosphäre bebrütet wird. Da sich die Sicherheit des Vibrionen-Nachweises nur auf 50 % belief, empfiehlt der Autor, für jede Untersuchung mindestens 5 - 6 Versuchstiere zu verwenden, um eine exakt Diagnose stellen zu können. MITSCHERLICH u. FORSCHNE (92) prüften die Empfänglichkeit von künstlich in den Brunstzustand versetzten, nichtträchtigen Meerschweinchen für Reinkulturen von 20 Vibrio-fetus-Stämmen und 7 apathogener Vibrionen-Stämmen. Den Meerschweinchen wurde zur Auslösung der Brunst 3 Tage vor und am Tage der Infektion 10 γ Oestrostilben (Sexocretin der Fa. Merck) subcutan injiziert. Zur Infektion wurde einem Teil der Tiere 1 ml Vibrionen-Leberbouillonkultur in die Vagina instilliert; dem anderen Teil der Tiere wurde dieselbe Dosis nach Eröffnung der Bauchhöhle direkt in den Uterus injiziert. Sechs bis 7 Tage später wurden die Tiere getötet und ihr

Uterus kulturell in Leberbouillon auf Vibrionen untersucht. Kein Tier war klinisch erkrankt oder zeigte post mortem irgendwelche makroskopisch erkennbaren Veränderungen an den Genitalorganen. Nur 3 Vibrio-fetus-Stämme konnten aus den Meerschweinchen reisoliert werden.

Tragende Meerschweinchen sind für eine Vibrio-fetus-Infektion empfänglich. LERCHE (84) teilte mit, daß tragende Meerschweinchen, die subcutan und conjunctival mit Vibrionen-Kulturmaterial infiziert wurden, 3 1/2 - 5 bzw. 3 - 8 Tage nach der Infektion abortierten. Die Infektion haftete jedoch nicht immer, vor allem nicht nach conjunctivaler Ansteckung. Der Autor führt dies auf die kurze Inkubation zurück. Auch FRAS u. Mitarbeiter (43), GARM u. Mitarbeiter (44), HOFF (56) und SNYMAN (141) berichten, daß sie tragende Meerschweinchen - vor allem intraperitoneal - infizierten, worauf die meisten dieser Tiere durchschnittlich nach 5 - 6 Tagen abortierten. HOFF (56) betont, daß die aus abortierten Schaf-Feten isolierten Vibrio-fetus-Stämme gegenüber tragenden Meerschweinchen keinen ausgesprochenen abortiven Effekt besaßen. CZARNOWSKI (21) gab an, daß auch aus Rinder-Feten isolierte Vibrio-fetus-Stämme nur bei einigen der mit ihnen geimpften Meerschweinchen Aborte verursachten. Der Autor konnte die Vibrionen aus der Vagina der betreffenden Muttertiere, nicht aber aus den abortierten Feten wieder herauszüchten.

BERTHELON u. TOURNUT (9) fanden Vibrio fetus 2 Tage nach subcutaner Infektion von Meerschweinchen in den uterinen Sekreten in Reinkultur wieder.

RISTIC u. MORSE (124) gelang es, tragende Meerschweinchen auf intraperitonealem, subcutanem, intravaginalem und peroralem Weg mit Vibrio fetus zu infizieren. Die Abortus-Rate lag bei den intravaginal

und peroral infizierten Tieren wesentlich niedriger als bei den intraperitoneal und subcutan infizierten. Vibrionen wurden aus dem Mageninhalt abortierter Feten und den Uteri der Muttertiere in Reinkultur isoliert. Bei einigen Meerschweinchen, die im Anschluß an die Infektion normal gebaren, konnte Vibrio fetus in Reinkultur aus dem Uterus gezüchtet werden. Ferner wurden Vibrionen bei einem Tier aus der Gallenblase in Reinkultur isoliert und bei einem weiteren in der Galle mikroskopisch nachgewiesen. Alle infizierten Tiere bildeten in ihrem Blutserum Agglutinine gegen Vibrio fetus aus, die Titer betrugen 1:80 - 1:640 bei subcutaner und 1:40 - 1:160 bei peroraler Infektion. MORSE u. RISTIC (96) untersuchten die Pathogenität von 21 Vibrionen-Stämmen verschiedener Herkunft gegenüber tragenden Meerschweinchen in drei Versuchsreihen. In Reihe I wurden 2 aus abortierten Rinder-Feten und 6 aus abortierten Schaf-Feten, in Reihe II 4 aus Vaginal-Schleim, 5 aus Bullen-Sperma und 2 aus Präputial-Spülflüssigkeit, in Reihe III 2 aus dem Blut von Menschen isolierte Stämme durch intraperitoneale Verimpfung an je 5 Versuchstieren geprüft. Die durchschnittlichen Abortus-Raten lagen in den Reihen I, II und III bei 62 %, 46 % und 70 %. Die Vibrionen wurden aus den Uteri fast aller Tiere, die abortiert hatten, in Reinkultur reisoliert, in einem Fall in Reinkultur auch aus der Leber. Ein aus Vaginal-Schleim und ein aus Sperma isolierter Vibrionen-Stamm verursachten jeweils nur bei 1 von 5 Meerschweinchen Abort. Ein weiterer aus Sperma kultivierter Stamm bedingte überhaupt keinen Abortus. Vibrionen konnten bei keinem dieser 15 Versuchstiere nachgewiesen werden, was die Untersucher veranlaßte, diese drei Vibrionen-Stämme als apathogen anzusehen. Serologische Untersuchungen ergaben, daß die Antigenstruktur einiger Vibrio-fetus-Stämme durch den Aufenthalt der Vibrionen im Meerschweinchen verändert wurde und die Pathogenität dieser Stämme für diese Versuchstiere zunahm. In einer

anderen Versuchsreihe abortierten 78 % der auf intraperitonealem Wege mit aus abortierten Rinder- und Schaf-Feten stammenden Vibrio-fetus-Stämmen infizierten Meerschweinchen, und zwar 1 - 13 Tage nach der Infektion. Die Vibrionen waren in den graviden Uteri während einer Beobachtungszeit von 15 Tagen lebensfähig.
Nach IWATA u. Mitarbeitern (69) abortierten die mit Vibrio fetus infizierten tragenden Meerschweinchen je nach dem Infektionsmodus in folgendem Umfang: bei intravenöser Infektion zu 80 %, bei intraperitonealer Infektion zu 50 % und bei subcutaner Infektion zu 30 %. Die Vibrionen wurden in den abortierten Feten sowie im Uterus und im uterinen Sekret der betreffenden Muttertiere wiedergefunden. Die Autoren vermuten, daß die Dauer der Gravidität zum Zeitpunkt der Infektion eine Rolle spielt.
ROBINSON u. Mitarbeiter (130) konnten Vibrio fetus aus dem Mageninhalt abortierter Meerschweinchen - Feten isolieren, deren Mütter einige Tage zuvor das Sperma infektionsverdächtiger Bullen injiziert bekommen hatten. Einige der so untersuchten Spermaproben waren in Eis rund 1500 km per Bahn verschickt worden.
Hamster wurden ebenfalls zu Versuchen verwendet. RISTIC u. Mitarbeiter (126) injizierten männlichen Hamstern Vibrio-fetus-Kultursuspension intraperitoneal und konnten diese Keime 7, 12 und 21 Tage post infectionem aus den Hoden von 70 % dieser Versuchstiere in Reinkultur isolieren. Die Blutserum-Agglutinations-Tests ergaben Titer von 1:640 - 1:1280. Vibrio fetus wurde auch aus dem nichtgraviden Uterus bei 4 von 10 ungeimpften Meerschweinchen, die mit den infizierten Männchen zusammen gehalten worden waren, in Reinkultur herausgezüchtet. Nach intraperitonealer Infektion männlicher Hamster mit bovinen, ovinen und humanen Vibrio-fetus-Stämmen gelang es in der Mehrzahl der Fälle, diese Keime aus den Hoden der infizierten Tiere in Reinkultur zu isolieren (RISTIC u. Mitarbeiter (128)).

MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92) injizierten männlichen Goldhamstern Leberbouillon-Kulturen von 20 pathogenen und 7 apathogenen Vibrionen-Stämmen auf intraperitonealem Wege. Je 4 Tiere wurden mit einem Stamm beimpft und 3 - 4 Wochen später getötet. Aus den Hoden der Hamster konnten nur 3 Vibrio-fetus-Stämme kulturell wiedergewonnen werden. Spezifische Serum-Agglutinine wurden von den Hamstern nur gegen 6 der 20 Vibrio-fetus-Stämme bis zu einem maximalen Titer von 1:640 ausgebildet. Fünf der 7 apathogenen Stämme regten die Bildung von Agglutininen bis zu einem Titer von 1:320 an. Ferner verimpften diese Autoren 5 Vibrio-fetus-Stämme intraperitoneal an entmilzte männliche sowie intravaginal an weibliche Goldhamster, die durch Vorbehandlung mit Oestrostil ben künstlich in den Brunstzustand versetzt worden waren. Nur 2 der 5 Stämme konnten aus dem Uterus von 1 bzw. 2 Hamstern reisoliert werden.

Kaninchen sind nach den Untersuchungen von LERCHE (84) und WITTE (179) für eine Vibrio-fetus-Infektion unempfänglich und als Versuchstiere ungeeignet. MUNDT (98) teilt dagegen mit, daß die von ihm mit Vibrio fetus an Kaninchen durchgeführten Versuche ähnliche Resultate wie die Meerschweinchen-Versuche hatten. Nichtträchtige Kaninchen, die intravenös infiziert worden waren, zeigten keine Symptome, doch konnten die Vibrionen bis zum 3. Tag nach der Infektion im Uterus nachgewiesen werden. Tragende Kaninchen abortierten, nachdem sie Vibrio fetus intravenös injiziert bekommen hatten. Es gelang, die Vibrionen im Magen der abortierten Feten und im Uterus der Muttertiere kulturell festzustellen.

LAWSON u. McKINNON (79) empfehlen den diagnostischen Meerschweinchen-Versuch für die Untersuchung von Abortus-Material heranzuziehen, da Vibrio fetus auf diese

Weise leichter in Reinkultur zu isolieren ist, besonders aus verunreinigtem Untersuchungsmaterial.

RISTIC u. Mitarbeiter (125) sehen das Meerschweinchen als geeignetes Versuchstier für experimentelle Studien an.

7. Morphologie und Beweglichkeit von Vibrio fetus.

BREED, MURRAY u. HITCHENS (13) beschreiben Vibrio fetus als einzeln oder in Verbänden vorkommende, kurze gebogene Stäbchen, die gewöhnlich durch 1 polare, selten durch 2 - 3 bipolare Geisseln lebhaft beweglich sind und in frischem Infektionsmaterial sowie in jungen Kulturen komma-förmige oder bumerang-ähnliche Gestalt von 3,5 - 6,5 μ Länge aufweisen.

Nach LERCHE (84) hat Vibrio fetus vielfach Komma-, Häkchen- oder Vibrionen-Form, doch finden sich neben diesen kurzen Gebilden auch lange, gewellte, spirilläre Formen mit 2 - 6 schraubenförmigen Windungen. In Tierkörper-Ausstrichen überwiegen in der Regel die kurzen Zellen, wohingegen in der Kultur fast stets lange Formen auftreten. Die Vibrionen sind 1,4 - 6,3 selten auch bis 11 μ lang und durchschnittlich 0,2 μ dick; ihre Windungen sind 0,7 - 1,75 μ lang, 0,35 - 0,7 μ hoch und erscheinen teils flach-, teils hochbogig. Die Vibrionen tragen eine endständige Geissel (ausnahmsweise wurde einmal ein Büschel von 4 Geisseln beobachtet) und sind lebhaft beweglich. Die sehr feinen, gewundenen Geißeln werden gewöhnlich bei Vibrionen mit 1 1/2 bis 3 Windungen gefunden und sind fast ebenso lang wie die Vibrionenzelle selbst.

In jungen Kulturen herrschen nach BINNS u. FINCHER (10, 11), LAING (78) und CZARNOWSKI (21) die kurzen komma- und S-förmigen, in älteren Kulturen dagegen

die längeren spirillären Zellformen vor. HUGHES (66) beobachtete, daß Vibrio fetus dazu tendierte, auf trockenen, festen Nährmedien kurze Formen und auf feuchten, festen Nährmedien lange Formen zu bilden.

Apathogene Vibrionen behalten im Gegensatz zu V. fetus auch bei fortlaufender Überimpfung im Laboratorium ihre kurze Form und auch ihre starke Beweglichkeit (FLORENT (35)). ROLLE u. MUNDT (131) berichten, daß in gefärbten Ausstrichen von 2 - 4 Tage alten Vibrio-fetus-Kulturen aus flüssigen wie auch von festen Nährmedien neben einzeln liegenden kurzen komma-förmigen Zellen auch einige längere gewundene Fäden erkennbar sind, die anscheinend aus mehreren aneinanderhängenden kurzen Zellen bestehen. Nach Mitteilung dieser Autoren sehen Vibrio-fetus-Zellen in jungen wie in alten Kulturen, gleichgültig ob sie von Blutagar oder von festen oder aus flüssigen Na-thioglykolat-Medien stammen, stets gleich aus, sie verändern ihre Komma-Form nicht. Im Gegensatz hierzu stellte STEGER (146) fest, daß Vibrio fetus in jungen Kulturen vorwiegend in Kurz-Formen (1,5 - 2,0 μ lang und 0,2 - 0,3 μ dick), in älteren Kulturen dagegen überwiegend in Lang-Formen (6,5 - 11 μ lang) auftritt. Auf festen Nährmedien (Schokolade-Agar) findet man zumeist die typischen Vibrionen als komma-förmige, fast gerade Häkchen mit 1/2 bis 1 Schraubenwindung und nur selten mehrfach gewundene Lang-Formen. In halbflüssigen oder flüssigen Nährmedien hingegen treten hauptsächlich die mehrfach geschlängelten Formen mit 2 - 5 und 6 Windungen auf. Kulturen ein und desselben Vibrio-fetus-Stammes sind auf festen Nährmedien vorwiegend als Kurz-Formen, in halbflüssigen Nährmedien aber als Lang-Formen zu beobachten. Bei der Beurteilung zahlreicher in Thiol-Medium gezüchteter Vibrio-fetus-Kulturen mit Lang-Formen wurde festgestellt - besonders wenn sie 4 - 6 Tage lang bebrütet oder auch 2 - 3 Monate lang bei 20° C aufbewahrt worden waren -, daß die Lang-Formen

aus 8 bis 16 und mehr hintereinanderliegenden Kurz-Formen zu bestehen schienen, wobei die stark gebogenen Komma-Stäbchen mit der Krümmung abwechselnd nach rechts und links liegend zu beobachten waren. Ähnliche Anordnungen sind bei alten absterbenden bzw. bereits abgestorbenen Kulturen in Thiol-Medium zu finden und können nach Ansicht von STEGER eindeutig als Involutions-Formen angesprochen werden. Die Deutung der Lang-Formen als eine spezielle Wachstumsanordnung der Kurz-Formen wird für denkbar gehalten. OLSON (106) betrachtet die langen wellenförmigen Gebilde der Vibrionen als deren höchstentwickelte Zellen. Verschiedene besonders große Exemplare der Vibrionen erschienen SPIEGL (142) in der Mitte auffallend dünn und wurden deshalb von diesem als Teilungsformen angesehen. SMITH u. TAYLOR (140) teilten seinerzeit mit, daß die komma- oder S-förmig gebogenen Stäbchen des Vibrio fetus - ihrer Ansicht nach durch unterbliebene Loslösung der Einzelkeime - eine Länge bis zu 25 μ erreichen und hierbei 10, 15 oder noch mehr Windungen haben können.

Nach DEDIÉ u. VOIGT (25, 168) enthalten frische, lebenskräftige Vibrio-fetus-Kulturen vorwiegend kurze komma-förmige Zellen, spirilläre Formen kommen auch nach Ansicht dieser Autoren durch S-förmige Aneinanderlagerung mindestens zweier kurzer Vibrionen-Zellen zustande und deuten ebenso wie die Fadenbildung und das Auftreten granulärer Formen auf ein ungeeignetes Milieu oder Alterung bzw. Erschöpfung der Kultur hin. In alten Kulturen beobachteten die Autoren nämlich oft spirilläre Gebilde von 18 μ Länge und mehr, die sich bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung als granuliert sowie feiner und plasmaärmer als die jungen, kurzen Vibrio-fetus-Zellen dastellten.

Schon McFADYEAN u. STOCKMAN (89) berichteten, daß die Vibrionen in alten Kulturen granuliert aussahen.

OLSON (106) vermutet, daß es sich bei den in älteren Kulturen auftretenden Granula um eine Entwicklungsform der Vibrionen handelt, die möglicherweise durch ungünstige Umweltbedingungen hervorgerufen wird. HARMS u. HÖRTER (52) beobachteten, daß die Zellen von Vibrio fetus in Blutagar-Kulturen nach 9tägiger Aufbewahrung in etwa 0,5 - 1,5μ große Granula zerfielen, die im Dunkelfeld eine lebhafte molekular-ähnliche Bewegung erkennen ließen, in mit Karbol-Gentianaviolett gefärbten Objektträger-Ausstrichen aber nicht mehr wie einheitlich gefärbte organische Elemente, sondern eher wie Farbstoff-Niederschläge aussahen. Bei der Fluoreszenz-Vital-"Färbung" mit Acridinorange nach STRUGGER[1] fluoreszierten diese Granula leuchtend grün. Obwohl dies nach STRUGGER darauf hinweist, daß die betreffenden Bakterien sicher lebensfähig sind, waren HARMS u. HÖRTER nicht davon überzeugt, daß es sich bei den Granula in diesem Fall um lebende Zellen handeln müsse. (Anm.: Nachuntersuchungen von GÄRTNER[2] haben die Zuverlässigkeit des STRUGGERschen Differenzierungs-Verfahrens schon früher nicht sicher bestätigen können.)

HUBRIG (58) studierte die Morphologie und das Wachstum der Vibrionen-Zellen, wobei er von Mikro-Kulturen

---

1) S. Strugger u. E. Hilbrich:
Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Acridinorange-Färbung; Dtsch. tierärztl. Wschr., 50 (1942): 121.

2) K. Gärtner:
Ein Beitrag zur Färbbarkeit der lebenden und toten Bakterienzelle;
Zschr. Hyg., 125 (1944): 86 - 99.

ausging. In seiner Veröffentlichung ist die Methode genau beschrieben, mit der eine völlig scharfe und kontrastreiche Darstellung der Zellen möglich war. Zu Beginn der Bebrütung in der Mikro-Kultur waren im Mikroskop (Vergrößerung 1:2000) nur komma-förmige Zellen sichtbar, die sich langsam zu strecken begannen, bis sie eine S-Form bekamen. Dann erfolgte in der Keim-Mitte eine Querteilung und es entstanden wieder komma-förmige Zellen. Vom Beginn der Bebrütung bis zur 1. Teilung dauerte es 3 - 4 Stunden. Die neugebildeten Komma-Formen schoben sich langsam parallel nebeneinander und wuchsen dann wieder zu einer langgestreckten Komma- oder S-Form aus. Erst nach 12 Stunden waren wieder 4 Komma-Formen entstanden. Die Teilung der Keime ging auf diese Weise in geometrischer Reihen-Folge weiter. Nach 46stündiger Bebrütung lagen erst 8 komma-förmige Zellen vor, doch war nach 50 Stunden bereits eine Verdoppelung der Zahl eingetreten. Eine beginnende Granula-Bildung deutete darauf hin, daß das Nährmedium anscheinend erschöpft war. Nach etwa 50stündiger Bebrütung konnten dann auch zahlreiche Zellen mit bis zu 10 Windungen beobachtet werden, die teilweise deutliche Einschnürungen erkennen ließen, so daß sich die Zellen aus einzelnen Komma- und S-Formen zusammenzusetzen schienen. Überhaupt traten in alten Kulturen lange, zum Teil unbewegliche Ketten-Formen sowie auch kokken-artige Zell-Formen auf.

In neuerer Zeit wurde die Morphologie von Vibrio fetus mit Hilfe des Elektronen-Mikroskopes untersucht.

ROLLE u. MUNDT (131) stellten dabei fest, daß junge Vibrio-fetus-Kulturen in flüssigen Nährmedien vorwiegend aus kurzen komma-förmigen Zellen bestanden, die einen an ihrer Seite verlaufenden, schmalen Saum von heller Tönung erkennen ließen, gegenüber dem das Zellinnere dunkel erschien. An den Zellpolen, wo sich der helle Saum erweiterte, war am oberen Ende im Bereich der Geißel-

ansatzstelle ein granula-ähnliches Körperchen zu sehen. Die Geißel stellte sich als sehr langer und feiner, gewellter Faden dar, der außen stumpf zu enden schien. Neben einzeln liegenden komma-förmigen Zellen fanden sich auch Zell-Verbände, die an beiden Enden des Verbandes begeißelt waren. In einzelnen Fällen entsprangen 2 Geißeln aus dem gleichen Pol. Die Untersucher konnten bei genauer Betrachtung erkennen, daß die Verbände aus mehreren mit den Polen aneinanderliegenden Zellen bestanden, wobei an den Anlagerungsstellen gewöhnlich keine Geißeln sichtbar waren. Gelegentlich wurden jedoch auch an diesen Stellen Geißeln beobachtet, die unter Umständen bei lichtmikroskopischer Betrachtung eine laterale Begeißelung vortäuschen können. (Anm.: Über eine solche Feststellung von lateralen Geißeln bei Vibrio fetus haben z. B. SMITH u. TAYLOR (140) berichtet.) Im äußeren Saum der Zellen waren partielle, rundliche Plasmaverdickungen erkennbar. Bei unbeweglichen Vibrio-fetus-Stämmen aus flüssigen Nathioglykolat-Kulturen konnten keine Geißeln beobachtet werden. Die an einem Ende zigarrenspitzförmig und am anderen mehr abgerundet erscheinenden Zellen wiesen im Endoplasma Verdickungen auf.

RHOADES (121) untersuchte 1 bovinen und 1 ovinen Vibrio-fetus-Stamm mit Hilfe des Elektronen-Mikroskopes bei Vergrößerungen von 1 : 3000 bis 1 : 10000. Beide Vibrionen-Stämme wurden in 3tägigen Intervallen auf frischen Tryptose-Schrägagar überimpft und bei 37° C in einer 10 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre bebrütet. Die frisch isolierten Kulturen beider Stämme bestanden fast gänzlich aus homogen erscheinenden komma- und S-förmigen Stäbchen, die 1,5 - 5,0 μ lang und 0,5 - 0,8 μ dick und durch eine polare, seltener zwei bipolare Geißeln lebhaft beweglich waren. Zwei bipolare Geißeln, soweit vorhanden, wurden vorwiegend bei S-förmigen Zellen sowie auch bei einigen längeren, wellenförmigen oder faserartigen Zellgebilden festgestellt (ebenso von BINNS u. FINCHER (11)). Bei fortlau-

fender Überimpfung nahmen die meisten Vibrio-Zellen eine lange, mehr faserartige Form an und ihr Zytoplasma bekam ein granuliertes Aussehen. Die Granula erschienen dabei in Form eines oder mehrerer Punkte an einem - meist dem der Geißelansatzstelle gegenüberliegenden - Ende bei einigen der komma-ähnlichen Zellen, wohingegen sie in einigen langen Zellen in ziemlich regelmäßigen Abständen entlang des Fadens angeordnet sichtbar waren. (Nach DAVIS u. Mitarbeitern+) können die in Bakterien festgestellten refraktilen Granula als Mitochondrien oder Kerne gedeutet werden). Im Gegensatz zu ROLLE u. MUNDT konnte RHOADES bei seinen Untersuchungen keine Segmentierung der langen und faserartigen Zell-Formen feststellen. Wurde der bovine Vibrio-fetus-Stamm in 4tägigen Intervallen auf vorher getrockneten Schrägagar überimpft, so erschienen die Vibrionen in einer kokkoiden Form, die auch in alten Kulturen und unter ungünstigen Wachstumsbedingungen auftrat und die eine einzelne Geißel sowie ein granuliertes Zytoplasma besaß. Die NaCl-Suspension einer Kultur, die viele kokkoide Zell-Formen enthielt, autoagglutinierte. Der bovine Stamm bildete leichter die verschiedenen Zell-Formen als der ovine Stamm.

Eine Kapselbildung bei Vibrio fetus wurde durch serologische Untersuchungen von WIIDIK u. HLIDAR (177, 152) festgestellt. Das Vorhandensein von Kapseln bei den Vibrionen konnte von ihnen auch durch die Quellungs-Reaktion, wie sie für die Identifizierung der Pneumococcen-Species üblich ist sowie durch Färbe-Verfahren nachgewiesen werden.

+) C. J. Davis, L. C. Winterscheid, P. E. Hartman u. St. Mudd: Cytological Investigation of the Mitochondria of Three Strains of Salmonella Typhosa; J. Histochem. and Cytochem., 1 (1953): 123 - 137 zit. nach Rhoades (121)

Beweglichkeit:

Die Vibrionen und speziell Vibrio fetus werden in der Literatur als außerordentlich beweglich und ihre Bewegungs-Art als für sie charakteristisch bezeichnet.

SMITH (138) ermittelte aber auch einige unbewegliche Stämme und berichtete, daß gewisse Vibrio-fetus-Stämme bei fortlaufender Kultivierung im Labor ihre Eigenbeweglichkeit schnell einbüßten. ROLLE u. MUNDT (131) fanden ebenfalls einige unbewegliche Stämme. In frischen und jungen Vibrio-fetus-Kulturen sahen DEDIÉ u. VOIGT (25, 168) kurze komma-förmige, lebhaft schraubenförmig bewegliche, "quirlende" Zellen, die außerdem sehr schnelle, ruckartige Vorwärts- und unvermittelt einsetzende, ebenso rasche, geradlinige Rückwärtsbewegungen ausführten und dadurch an das Gewimmel eines tanzenden Mückenschwarmes erinnerten. Auch STEGER (146) bedient sich für die enorm raschen Massen-Manövrierbewegungen der Vibrionen des Vergleiches mit dem Mückenschwarm. Er stellte fest, daß die Vibrionen junger Kulturen und die Kurz-Formen lebhafter beweglich waren als die Lang-Formen und die Vibrionen in älteren Kulturen. Nach ROLLE u. MUNDT (131) verläuft die Bewegung der Vibrionen meist weniger raumfördernd als vielmehr schnell um die Längsachse rotierend, wobei von den komma-förmigen Zellen kurze rasante Vorwärtsbewegungen ausgeführt werden; hängen jedoch mehrere Zellen aneinander, so bewegen sich diese ruckartig vor- und rückwärts. Diese Feststellungen gelten für Vibrio fetus aus jungen bis zu 10 Tage alten Kulturen. Längere Vibrionen aus älteren Kulturen mit mehreren Windungen sind weit weniger beweglich. HUBRIG (58) stellte fest, daß die Beweglichkeit der Keime mit einem höheren Feuchtigkeitsgehalt der Nährmedien zunahm.

Vibrio fetus in Infektionsmaterial:

EHRLICH (32) konnte in Nativ-Präparaten vom Lochialsekret einer Kuh, die etwa 8 Stunden nach erfolgtem Abort an Ort und Stelle mikroskopisch durchgesehen wurden und zahlreiche, teils noch bewegliche Vibrionen enthielten, nur S-förmige Zellen mit zwei oder mehr Windungen beobachten. Im Labmageninhalt abortierter Rinder-Feten wurden von DEDIE u. VOIGT (25) besonders häufig die langen spirillären und nur wenig beweglichen Formen von Vibrio fetus ermittelt. HUBRIG (58) sah in Präputial-Spülproben und Sperma von Bullen fast durchweg sehr bewegliche Komma- und S-Formen, in Feten dagegen sehr viele lange Formen, die kaum noch beweglich waren, sich nur mit Mühe weiterzüchten ließen und zum Teil auch ihre Beweglichkeit nicht wiedererlangten. STEGER (146) stellte in von abortierten Rinder-Feten stammendem Untersuchungsmaterial dagegen vorwiegend die kurzen komma- und S-förmigen Zellen fest. An anderer Stelle teilt auch VOIGT (168) mit, daß er in Infektionsmaterial meist kurze, lebhäft bewegliche Vibrionen fand. LERCHE (84) und BEER (8) berichteten ebenfalls, daß in fetalen Geweben und Mageninhalten in der Regel die komma- oder häkchen-förmigen Vibrio-fetus-Zellen anzutreffen waren.

8. Färbbarkeit von Vibrio fetus; Färbe-Methoden.

Hinsichtlich mikroskopischer Untersuchungsmethoden sei nur darauf hingewiesen, daß in der Literatur für die Untersuchung von Nativ-Präparaten (Deckglas- u. Tropfen-Präparate) allgemein das Phasenkontrast-Verfahren mit und ohne Ölimmersion empfohlen wird, das die meisten Autoren dem Dunkelfeld-Verfahren vorziehen. Gefärbte Ausstrich-Präparate werden wie

üblich im Hellfeld mit Ölimmersion mikroskopiert. Bei der mikroskopischen Untersuchung verdächtigen Materials ist es zweckmäßig, zunächst Nativ-Präparate bei Phasenkontrast oder im Dunkelfeld durchzusehen und dann erst die gefärbten Ausstrich-Präparate zu prüfen, denn VOIGT (168) stellte fest, daß die Vibrionen in den letzteren oft infolge Quellung durch unsachgemäße Fixierung nicht in typischer Gestalt, sondern vielmehr fast gestreckt und unverhältnismäßig plump als Kurz-Stäbchen in Erscheinung treten.

BRYNER u. FRANK (19) entwickelten eine befriedigende Färbemethode, die es ermöglicht, lebende Vibrionen auch gut mit einem Standard-Mikroskop im Hellfeld zu betrachten, da die Keime nach der Färbung noch einige Minuten aktiv beweglich bleiben. Die hierzu erforderliche Farblösung hat folgende Zusammensetzung:

Kristallviolett	0,1 g
Methylenblau-chlorid	0,5 g
Ammonium-oxalat	0,2 g
Äthylalkohol	5,0 ml
Aqua dest.	120,0 ml

Nach dem Auflösen der Farbstoffe in Alkohol und Aqua dest. werden zu dieser Lösung noch 187,0 ml physiologische NaCl-Lösung zugefügt.

Zur Anfertigung des Präparates wird ein Tropfen Farblösung auf einen Objektträger gebracht, etwas Untersuchungsmaterial mit einer Platinöse oder -nadel darin verteilt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Vibrionen und auch andere Bakterien nehmen den Farbstoff allmählich auf und werden dabei unter Verwendung der Ölimmersion im Hellfeld sichtbar.

Die meisten Autoren stellten fest, daß Vibrio fetus mit gewöhnlichen Anilin-Farbstoffen recht gut färbbar ist, wenn man solche Farblösungen eine längere Zeit auf die Aus-

striche einwirken läßt. Involutions-Formen von Vibrio fetus aus alten Kulturen sind nach SPIEGL (142) und STEGER (146) meist schlecht färbbar.

Vibrio fetus verhält sich gegenüber der Gram-Färbung negativ, wobei die Beurteilung der Ausstriche hinsichtlich Zahl und Form der Vibrionen infolge der meist nur schwachen Rotfärbung und des Fehlens von Farbkontrasten mitunter schwierig ist (STEGER (146)). Unbestritten ist der Wert der Gram-Färbung für die Kontrolle von Vibrio-fetus-Kulturen auf Reinheit. Aus Veröffentlichungen amerikanischer Forscher ist zu entnehmen, daß diese auch Ausstriche von vibrio-verdächtigem Untersuchungsmaterial vorwiegend nach GRAM färben. Auch LAWSON und McKINNON (79, 81) bedienten sich dieses Färbe-Verfahrens für die mikroskopische Untersuchung von Infektionsmaterial. BINNS u. FINCHER (11) dehnten die Gram-Gegenfärbung auf 5 - 10 Minuten aus.

Die Färbung mit verdünntem Karbol-Fuchsin mit nachfolgender Differenzierung in 1%iger Essigsäure, wie sie von LERCHE (84) angegeben und als besonders gut geeignet bezeichnet wurde, wird auch von DEAS (22), STEPKOWSKI u. WINIARSKI (148) und WEIKL (175) bevorzugt. Ebenso hat STEGER (146) diese Färbe-Methode als zufriedenstellend befunden. Die Farblösung soll 3 - 5 Minuten auf die vorher hitzefixierten Ausstriche einwirken.

Die Färbung mit Karbol-Gentianaviolett ist nach STEGENGA (143), HARMS u. HÖRTER (52) und STEGER (146) am zweckmäßigsten, weil sie rasch durchführbar und zuverlässig ist. Die luftgetrockneten, keinesfalls hitzefixierten Ausstriche werden 30 Sekunden lang mit mindestens 30 Tage alter, jeweils frisch filtrierter Farblösung gefärbt, die anschließend mit dünnem Wasserstrahl vorsichtig abgespült wird. Das aufliegende Wasser saugt man nicht mit Fließpapier auf, sondern läßt es verdunsten.

Die Doppelfärbung nach Giemsa wird von VOIGT (170) bevorzugt. Auch LERCHE (84), WITTE (179) und STEGER (146) erhielten mit ihr gute Bilder, wohingegen GAUTHIER u. CHEVÉ (45) mit diesem Färbe-Verfahren sowie mit Toluidinblau bei abgeschabtem Untersuchungsmaterial keine guten Erfahrungen machen konnten.

Alkalische Methylenblau-Lösung nach LOEFFLER eignet sich nach GMINDER (46), WITTE (179) und STEGER (146) ebenfalls zur Färbung, wenn man sie längere Zeit auf die Ausstrich-Präparate einwirken läßt. LERCHE (84) war allerdings mit dieser Färbe-Methode weniger zufrieden.

Die Färbung mit 3%iger wäßriger Victoriablau-Lösung hat sich nach ROLLE u. MUNDT (131) am besten bewährt; die Färbe-Dauer wird von ihnen mit 1 Minute angegeben. Auch STEGER (146) und HUBRIG (58) berichten über zufriedenstellende Resultate mit dieser Farblösung.

Die Brucellen-Färbung nach HANSEN wird nach Angabe von STEGENGA (143) in Holland sehr häufig angewendet. Die Vibrionen nehmen bei dieser Färbung ein orangegelbes Aussehen an. VAN RENDSBURG (120) bediente sich ebenfalls des Färbe-Verfahrens nach HANSEN sowie des Verfahrens nach KÖSTER.

OLSON (106) beschrieb eine Färbe-Methode, die besonders für wissenschaftliche Untersuchungen über Vibrionen geeignet ist. Die vorsichtig hitzefixierten Ausstriche werden dabei folgendermaßen behandelt:

1 Minute lang mit Victoriablau-Lösung (5 ml 10%ige wäßrige Lösung von Victoriablau + 100 ml Aqua dest.) färben,

mit Wasser abspülen und trocknen lassen,

1 Minute lang mit Safranin-Lösung (3%ige wäßr. Lsg.) färben,

mit Wasser abspülen und ablaufen lassen,

15 Sekunden lang mit H_2SO_4 (0,05%ig) entfärben,

mit Wasser abspülen und trocknen lassen,

1 - 2 Minuten lang mit Eosin-Lösung (1%ige wäßr. Lsg.) gegenfärben,

mit Wasser abspülen und trocknen lassen.

Für Routine-Untersuchungen, für die diese Färbe-Methode zu umständlich ist, empfiehlt OLSON die sogenannte "V.-K."-Färbung nach OLSON u. BODÉN (Scand. Vet. Tidskr. 1944).

GAUTHIER u. CHEVÉ (45) berichten, daß das Fuchsin nach ZIEHL sich zwar gut zur Färbung der Vibrionen eignete, jedoch den Nachteil der häufig vorkommenden Überfärbung besaß. Sie bevorzugen deshalb die Färbe-Methode nach VAGO zum Nachweis von Spirochaeten, wie sie von H. JOUG beschrieben worden ist. Hierbei werden die lufttrockenen,aber nicht fixierten Ausstriche wie folgend behandelt :

3 Minuten lang mit Quecksilberchromat-Lösung (gesättigte wäßrige Lösung) färben,

mit Wasser abspülen und abtropfen lassen,

3 Minuten lang mit Methylviolett-Lösung (gesättigte wäßrige Lösung) färben,

mit Wasser abspülen; Ausstriche anschließend an der Luft trocknen lassen (kein Fließpapier!).

Mit diesem Verfahren lassen sich die Vibrionen gut färben. In Ausstrichen von Plazenta- oder fetalem Organgewebe sowie Mageninhalt erscheinen auf hellem, fast ungefärbtem Grund die Gewebezellen violett und die Mikroorganismen sehr dunkel, fast schwarz, wodurch die Präparate sehr gut zu übersehen sind. Nach Mitteilung

dieser Autoren sind mikroskopisch nur 25 % der kulturell vibrio-positiven Fälle zu erfassen.

Die Darstellung der Geißeln mit Hilfe der bekannten Färbe-Methoden gelang nach Mitteilung von ROLLE u. MUNDT (131) nicht regelmäßig; deshalb wird für die Untersuchung des Geißelapparates der Vibrionen die Elektronen-Mikroskopie empfohlen. Auch HUBRIG (58) berichtet, daß die Geissel-Darstellung in Nativ-Präparaten und durch Färbung schwierig war und nur selten glückte.

9. Kultivierung von Vibrio fetus.

a) Temperatur - Optimum:

Für das Wachstum und die Vermehrung von Vibrio fetus wird in der Literatur übereinstimmend eine Temperatur von 37°C als optimal bezeichnet.

KUZDAS u. MORSE (77) stellten durch eingehende Untersuchungen über die Frage des Temperatur-Optimums für die Züchtung von Vibrio fetus und anderen Vibrionen fest, daß sich fast alle Vibrionen bei einer Temperatur von 37°C am besten vermehren; eine Ausnahme hiervon machten nur Vibrio percolans und Vibrio rubicundus, die am besten bei Temperaturen von 28°- 30°C gediehen. Die höchsten Temperaturen, bei denen die meisten Vibrionen noch wuchsen, lagen bei 40° - 43° C; Vibrio percolans, V. rubicundus, V. cuneatus und V. jejuni stellten bei diesen Temperaturen ihr Wachstum ein. Tierpathogene Vibrionen der katalase-positiven und H_2S-negativen Gruppe (V. fetus) ließen noch bei 15°C ein sichtbares Wachstum erkennen, wohingegen die Vibrionen der katalase-negativen und H_2S-positiven Gruppe, die aus Sperma von Bullen und Vaginal-Schleim von Kühen isoliert worden waren (V. bubulus), ein solches zwar noch bei 20°C, aber nicht mehr bei 15°C zeigten. Vibrio metschnikovi, V. percolans, V. rubicundus

und V. cuneatus konnten noch bei 5°C gezüchtet werden. KUZDAS u. MORSE berichten daher, daß sie die verschiedenen Vibrionen-Arten oder -Typen auf Grund ihrer Fähigkeit, noch bei Temperaturen von 5, 15 oder 20°C zu wachsen, differenzieren konnten.

b) Optimale Wachstums-Atmosphäre :

In der Literatur wird Vibrio fetus übereinstimmend als mikroaerophil bezeichnet, doch werden unterschiedliche Angaben hinsichtlich der genauen gasförmigen Zusammensetzung der Atmosphäre gemacht, die für das optimale Wachstum von Vibrio fetus erforderlich ist. Nach allgemeiner Ansicht ist es zweckmäßig, die Vibrio-fetus-Kulturen in Vakuum-Exsikkatoren bei vermindertem Luftdruck und einer um 10-20 % erhöhten CO_2-Spannung zu bebrüten. Die von vielen Forschern verwendeten flüssigen und halbflüssigen Nährmedien haben ein solches Sauerstoff-Redox-Potential, daß die Vibrionen in ihnen auch unter normalen atmosphärischen Verhältnissen gut wachsen. Nach GAUTHIER u. CHEVÉ (45) sollte nur die Erstkultivierung der Vibrionen in einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre erfolgen. HUBRIG (58) berichtet, daß Vibrio fetus nach mehreren Passagen auf Blutagar-Platten auch ohne erhöhte CO_2-Spannung gezüchtet werden konnte; es gelang dem Autor dann, die Vibrionen lediglich unter geringem Vakuum ohne CO_2-Zugabe zum Wachsen zu bringen. Unter aeroben Bedingungen konnte Vibrio fetus jedoch nicht kultiviert werden.

REICH, MORSE u. WILSON (119) stellten durch umfangreiche Versuche fest, daß das Wachstum der Vibrionen (bovine und ovine, katalase-positive und katalase-negative Stämme) in dem Maße zunimmt, wie die O_2-Spannung in der umgebenden Atmosphäre her-

abgesetzt wird, jedoch nur bis zu einem bestimmten Punkt, an dem eine sehr niedrige O_2-Konzentration ein wachstumshemmender Faktor zu werden beginnt. Im allgemeinen tritt das maximale Wachstum der Vibrionen in einer Atmosphäre auf, in der die Konzentration des Rest-Sauerstoffes 6-8 % beträgt, was Teilspannungen von 225 mm Hg atmosphärischer Luft und von 475 mm Hg Zusatzgas entspricht; der Gesamtdruck (Enddruck) im Vakuumexsikkator beläuft sich dann auf 700 mm Hg (Standard-Druck). Als Zusatzgase dienten zur Verminderung der O_2-Spannung neben CO_2 auch Wasserstoff, Stickstoff und Helium. Es zeigte sich, daß die Verwendung von CO_2 im Vergleich zu der der anderen Gase kein besseres Wachstum der Vibrionen zur Folge hatte. Dies beweist, daß die Vibrionen das CO_2 nicht als solches benötigen, sondern daß es nur zur Herabsetzung der O_2-Spannung dient. Bemerkenswert war, daß CO_2 in hohen Konzentrationen sogar hemmend auf das Wachstum der Vibrionen einwirkte, was bei den anderen Gasen nicht der Fall war. Im allgemeinen wurden bei der Verwendung der verschiedenen Gase vergleichbare Wachstumskurven erhalten. Viele, wenn auch nicht alle Stämme reagierten jedoch auf die Anwesenheit von Wasserstoff im Vergleich zu der der anderen Gase mit beträchtlich stärkerem Wachstum. Einige wenige Vibrionen-Stämme konnten bei höheren O_2-Spannungen als die meisten übrigen kultiviert werden, was zum Teil als Ausdruck der schon früher gemachten Beobachtung gewertet wurde, daß nämlich die Vibrionen in gewisser Weise an aerobe Wachstumsverhältnisse adaptiert werden können. REICH u. Mitarbeiter ermittelten ferner, daß bovine und ovine Vibriofetus-Stämme entsprechend ihrer Herkunft auf Grund der Tatsache differenziert werden können, daß die ovinen Stämme noch in einer Atmosphäre von 24 mm Hg

Luft und 676 mm Hg Stickstoff gedeihen, in der die bovinen Stämme kein sichtbares Wachstum mehr zeigten.

Nach FLORENT (35) und anderen Autoren ist Vibrio bubulus (katalase-negativ) im Gegensatz zu dem mikroaerophilen Vibrio fetus (katalase-positiv) streng anaerob.

c) Optimaler pH-Wert (pH-Puffer):

Aus der Literatur ist ersichtlich, daß die pH-Werte der einzelnen Nährmedien in den verschiedenen Laboratorien unterschiedlich eingestellt werden; sie schwanken je nach Laboratorium und Nährmedium zwischen pH 5, 8 und pH 7, 6. VIZY (167) beobachtete, daß die Vibrionen ihre charakteristische Form behielten, wenn der pH-Wert im Nährmedium im Bereich von pH 5, 8 bis pH 6, 0 lag. Wurde der pH-Wert mehr nach der alkalischen Seite verschoben, so traten in den Vibrionen-Kulturen kokkoide Gebilde auf. Nach FLORENT (37) ist Vibrio fetus gegenüber Schwankungen des pH-Wertes sehr empfindlich.

KUZDAS u. MORSE (77) stellten Versuche an, um die pH-Toleranz von Vibrio fetus und anderen Vibrionen zu ermitteln. Hierbei bebrüteten sie die verschiedenen Vibrionen-Stämme 2 Wochen lang unter aeroben Bedingungen bei 37°C in Albimi-Brucella-Bouillon+), die 0, 1 % Agar enthielt und deren Wasserstoffionenkonzentration durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge verschieden hoch eingestellt worden war. Die Toleranz-Bestimmungen wurden bei pH-Werten von 4, 9, 5, 4, 6, 0, 6, 5, 7, 5, 8, 0, 8, 4, 8, 8 und 9, 3 vorgenommen. Mit Ausnahme von Vibrio jejuni zeigten alle Vibrionen-Arten oder -Typen das beste Wachstum, wenn die Wasserstoffionenkonzentration im Nährmedium im Bereich von pH 6, 0

+) Albimi Laboratories Inc., Brooklyn 2 N. Y.

bis pH 8,4 lag. Bei einem pH-Wert von 5,4 wuchsen : Vibrio fetus (bovine, ovine und humane Stämme), V. bubulus, V. percolans und V. cuneatus, bei pH 6,0 alle Vibrionen außer V. jejuni (begann erst bei pH 6,5 zu wachsen), bei pH 8,4 noch alle Vibrionen, bei pH 8,8 noch alle Vibrionen mit Ausnahme der bovinen und humanen Vibrio-fetus-Stämme und bei pH 9,3 noch Vibrio metschnikovi, V. percolans, V. cuneatus, V. comma und V. tyrogenus. Es konnte also festgestellt werden, daß Vibrio fetus bei Wasserstoffionenkonzentrationen von pH 5,4 bis pH 8,4, am besten jedoch im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,4 wächst.

Nach DEDIÉ (23) gedeihen die katalase-positiven und die katalase-negativen Varianten der Vibrionen bei pH 8,0 bis pH 9,0 in der Regel gleich gut, wohingegen bei pH 6,8 bis pH 7,8 nur die katalase-positiven Varianten wachsen. DEDIÉ beobachtete, daß, wenn der pH-Wert in Blutagar variiert wurde, im Bereich von pH 7,0 keine katalase-negativen Vibrionen mehr gediehen; die katalase-positiven Vibrionen stellten dagegen ihr Wachstum erst bei einem pH-Wert unter 6,8 ein. Auf zuckerhaltigem, festen Nährmedien zeigte sich die gleiche Erscheinung, wenn Impfstriche eines Säurebildners wie E. coli ähnlich wie beim CAMP-Test an Impfstriche von katalase-positiven und -negativen Vibrionen gelegt wurden. Hierbei war die Hemmzone des Coli-Striches gegenüber katalase-negativen Vibrionen mit etwa 8 mm deutlich größer als gegenüber katalase-positiven Vibrionen mit 2-3 mm. Dieser Effekt trat nur auf zuckerhaltigen Medien in Erscheinung, was nach Ansicht von DEDIÉ die Bedeutung des pH-Wertes bei der Züchtung von Vibrio fetus unterstreicht. Es war außerdem notwendig, diese Medien in einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre zu bebrüten. Von anderer Seite sind diese Feststellungen bisher nicht bestätigt worden.

Da sich der pH-Wert von Nährmedien mit dem Wachstum, Absterben und Zerfall von Begleitbakterien in verunreinigten Vibrionen-Kulturen änderte, ohne die Vibrionen bemerkenswert zu beeinflussen, schließt HUBRIG (58), daß die Vibrionen an den pH-Wert des Nährmediums keine allzu großen Ansprüche stellen.

STEGER (146) bebrütete Vibrio-fetus-Stämme in Bacto-Thiol-Medium (Difco+)) 4 Tage lang bei 37°C bei 20 % Luftdruckverminderung und Anwesenheit von 20 % CO_2 und bewahrte die Kulturen anschließend über einen Zeitraum von 10 Monaten bei + 20°C auf. Der pH-Wert des unbeimpften Thiol-Mediums betrug im Durchschnitt 7,01 (max. 7,22 - min. 6,86) und der des mit Vibrio fetus bewachsenen im Durchschnitt 8,07 (max. 8,40-min. 7,65). Durchschnittlich wurde infolge des kulturellen Wachstums der pH-Wert des unbeimpften Nährmediums um 1,07 (max. 1,54-min. 0,55) nach der alkalischen Seite verschoben. Die Alkalisierung beruhte dabei auf NH_3-Bildung. Bemerkenswert erschien dabei, daß Thiol-Kulturen mit sehr gutem Wachstum die größte Differenz (1,54) und schlecht gewachsene Kulturen nur eine geringe (0,76) pH-Differenz zeigten. Obwohl das DIFCO-Manual (26) für das Bacto-Thiol-Medium (unbeimpft) den pH-Wert mit 7,2 angibt, stellte STEGER fest, daß diejenigen Thiol-Chargen am dichtesten bewachsen waren, deren pH-Werte (unbeimpft) zwischen 6,8 und 6,9 und nach Abschluß des kulturellen Wachstums zwischen 8,17 und 8,40 lagen. Nach den Untersuchungen von STEGER findet das Alter der Vibrio-fetus-Kulturen in Thiol-Medium jedoch keinen Ausdruck in einer Veränderung des pH-Wertes. KUZDAS u. MORSE (77) beobachteten, daß der pH-Wert in Albimi-Brucella-Bouillon mit 0,1 % Agar-Gehalt nach 2-wöchiger Bebrütung bei 37°C durch das Vibrionen-

+) Difco Laboratories Inc., Detroit Mich.

Wachstum von ursprünglich pH 6,9 nach pH 7,2 - 8,6 verschoben worden war. Hierbei war kein Unterschied in den Kulturen von verschiedenen Vibrionen-Arten erkennbar.

d) Optimale Agar-Konzentration :

Zur Züchtung von Vibrio fetus und verwandten Vibrionen werden in den einzelnen Laboratorien verschiedene Nährflüssigkeiten sowie Nährmedien verwendet, die durch den Zusatz von 0,1 - 2,0 % Agar entweder eine halbflüssige, halbfeste oder feste Konsistenz haben. NOWAK (104) und STEGENGA (143) benutzten daneben auch Medien, deren Agar-Gehalt sogar 3 % betrug.

Die flüssigen und halbflüssigen werden gegenüber den festen Nährmedien im allgemeinen bevorzugt. Auf festen Nährböden ist das Wachstum der Vibrionen nach HARMS u. HÖRTER (52) sehr unterschiedlich und kann ohne erkennbaren Grund plötzlich ganz abreißen. Auch ROLLE u. MUNDT (132) beurteilen das Wachstum auf festen Nährmedien ungünstig. RIKARD-BOLL (122) schien das Wachstum der Vibrionen auf festen Nährmedien, das nach HANSEN u. Mitarbeitern (51) im wesentlichen auch nach der Adaptation an die Züchtung im Laboratorium spärlich ist, nicht charakteristisch zu sein.

Für die Züchtung der Vibrionen und die Aufbewahrung der Kulturen sind nach HANSEN u. Mitarbeitern (51), HARMS u. HÖRTER (52) und DEDIÉ u. VOIGT (25, 168) flüssige Nährmedien am besten geeignet. Bessere Voraussetzungen für das Wachstum von Vibrio fetus bieten nach Mitteilungen von HUDDLESON u. FORREST (63), GAUTHIER u. CHEVE (45), ROLLE u. MUNDT (132) und HUBRIG (58) jedoch Medien, die 0,1 % Agar enthalten. Feste Nährmedien dienen im allgemeinen nur zur Anzüchtung von Untersuchungsmaterial, zur Isolierung von Vibrionen aus

verunreinigten Kulturen und zur Gewinnung von Antigen.

KUZDAS u. MORSE (77) kultivierten Vibrionen in Albimi-Brucella-Bouillon[+)] und in Albimi-Brucella-Bouillon mit einem Agar-Gehalt von 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 %, um die optimale Agar-Konzentration für das Wachstum von Vibrio fetus und verwandten Vibrionen zu ermitteln. Die Medien wurden 7 Tage lang bei 37°C unter aeroben Verhältnissen bebrütet. Von 48 untersuchten Vibrio-fetus-Stämmen boviner, oviner und humaner Herkunft zeigten 29 Stämme das beste Wachstum in einem Medium, das 0,075 % Agar enthielt, und 4 Stämme in einem Medium, das 0,1 % Agar enthielt. Weitere 15 Stämme wuchsen gleich gut, wenn in den Nährmedien 0,075 % oder 0,1 % Agar enthalten waren. Die Untersucher schlossen daher aus ihren Versuchsergebnissen, daß eine Agar-Konzentration von 0,075 - 0,1 % im Nährmedium optimal für das Wachstum von Vibrio fetus und verwandten Vibrionen ist.

e) Flüssige Nährmedien :

LAWSON u. McKINNON (79, 81) verwenden zur Züchtung von Vibrionen Pepton-Bouillon (1 % Bacto-Pepton, 0,5 % NaCl, 0,5 % Lemco-Fleischextrakt, 1000 ml Aqua dest; pH 7,6; zu 9 ml in Kultur-Röhrchen abfüllen und 15 Min. bei 0,763 atü autoklavieren), der sie einen Tag vor der Beimpfung pro Röhrchen 1 ml defibriniertes Rinderblut zusetzen und die dann über Nacht bei 37°C bebrütet wird, damit sich das Blut setzen kann. Die beimpften Röhrchen werden 3 Tage lang bei 37°C in Gegenwart von 10 % CO_2 bebrütet. STEGER (146) benutzte Pepton(1 %)-Kochsalz (0,85 %)-Wasser und Pepton(4 %)-Fleischwasser und

+) Albimi Laboratories Inc., Brooklyn 2 N. Y.

bezeichnet das Wachstum der Vibrionen in beiden Medien als gut; Vibrio fetus wuchs bei 37°C im normalen Brutschrankmilieu innerhalb von 18 Stunden zu einem feinen Oberflächenhäutchen aus. Nach GRIMM (49) wachsen die Vibrionen auch in Serum-Bouillon gut. STEPKOWSKI (147) empfiehlt eine Nährbouillon, die 2 % Glucose und 10 % defibriniertes Hammelblut enthält (10 Min. lang kochen, pH 7,4 einstellen und dreimal im Dampftopf sterilisieren). HARMS u. HÖRTER (52) verwendeten Nährbouillon, sterile Magermilch und Leber-Bouillon, in denen der pH-Wert stets 7,4 betrug. In der Nährbouillon war das maximale Wachstum der Vibrionen nach 3 - 4tägiger aerober Bebrütung bei 37°C erreicht. Nach 6wöchigem Brutschrankaufenthalt bei 37°C waren im Dunkelfeld gut ausgebildete, unbewegliche Vibrionen mit 1 - 3 Windungen und faserartigen Formen erkennbar. In der gleichmäßig getrübten Bouillon hatte sich geringer Bodensatz gebildet; eine Kahmhaut war nicht sichtbar. Nach dieser Zeit konnten die Vibrionen noch auf 10%igem Rinderblutagar nach 7tätiger Bebrütung unter erhöhter CO_2-Spannung zum Wachsen gebracht werden. Übertragungsversuche nach mehr als 6 Wochen gelangen nicht mehr, obwohl das mikroskopische Bild im Dunkelfeld unverändert war. In der sterilen Magermilch konnten die Vibrionen ohne Schwierigkeiten gezüchtet werden; noch nach 3monatigem Aufenthalt im normalen Brutschrank bei 37°C waren in der Milch zahlreiche, lebhaft bewegliche Vibrionen feststellbar, wobei aber keine Fadenbildung der Keime wie in der Nährbouillon auftrat. Die Vibrionen konnten noch nach 5 Monaten (max.) auf Blutagar übertragen werden. Die Magermilch sah zu dieser Zeit in der oberen Hälfte bräunlich und in der unteren Hälfte, wo sich Casein-Flocken abgelagert hatten, weißlich aus; eine Gerinnung der Milch trat nicht ein. In der Leberbouillon zeigte sich ein beträchtlich stärkeres Wachstum als in Nährbouillon und Magermilch, wobei die Leber-Bouillon allerdings nie in dem Maße wie durch das Wachstum anderer Bakterien

getrübt wurde. Nach 5-monatigem Brutschrankaufenthalt bei 37°C waren im Dunkelfeld sehr zahlreiche, äußerst bewegliche Vibrionen nachweisbar. Nach 8 Monaten war noch der kleinere Teil der Vibrionen beweglich, nach 10 Monaten jedoch konnten nur noch einzelne bewegliche Keime festgestellt werden, die träge um die Längsachse rotierten. Zu diesem Zeitpunkt gelang aber noch die Übertragung der Vibrionen auf Blutagar, der dann allerdings 5 - 6 Tage bebrütet werden mußte, ehe ein sichtbares Wachstum auftrat. Eine Weiterzüchtung der Vibrionen nach 13-monatiger Aufbewahrung der Leber-Bouillon-Kulturen im normalen Brutschrankmilieu bei 37°C war nicht mehr möglich. Demnach konnten Vibrio-fetus-Stämme in Leberbouillon 9 Monate lang im normalen Brutschrankmilieu bei 37°C (ohne CO_2-Zufuhr) lebens- und vermehrungsfähig gehalten werden. Die Kultur-Röhrchen mußten jedoch mit Paraffin abgeschlossen werden, damit die Kulturen nicht austrockneten. Auch BEER (8) machte mit Leber-Bouillon bei der Züchtung von Vibrionen gute Erfahrungen.

ROLLE u. MUNDT (132) kultivierten Vibrio fetus in Peptonwasser mit Leberzusatz, die folgendermaßen hergestellt wurde: 1000 ml Aqua dest., 10 g Pepton "Witte"und 5 g NaCl wurden gemischt und 20 Minuten lang im Dampftopf gekocht; nach der Abkühlung wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt; 250 g rohe Rinderleber (die Leber anderer Tierarten war für das Wachstum von Vibrio fetus weniger gut geeignet) wird in 8 cm lange und 1 cm breite Scheiben geschnitten, dem Substrat zugesetzt und dies 2 Stunden lang bei 20°C stehen gelassen; anschließend wird das Medium an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 30 Minuten lang im Dampftopf erhitzt; danach bleibt es so lange bei Zimmertemperatur stehen, bis sich die Leberstückchen gesetzt haben; die überstehende Flüssigkeit wird sodann zu 5 ml in Kultur-Röhrchen abgefüllt. Nach den Erfahrungen von ROLLE u. MUNDT war dieses Nährsubstrat

zur Kultivierung von Vibrio fetus sehr gut geeignet. Mit gleich gutem Erfolg konnte auch das Medium als Ganzes in Form der Tarozzi-Bouillon verwendet werden. Nach DEDIÉ u. VOIGT (25, 23, 168, 169) ermöglicht die Leber-Leber-Bouillon n. Tarozzi eine sehr rasche Vermehrung der Vibrionen; außerdem soll sie zuverlässiger als die Thioglycolat-Medien arbeiten.

MUNDT (100) beschrieb ein Kultur-Verfahren, das sich besonders für die Gewinnung von Antigenen eignete. Es besteht darin, daß Vibrio fetus auf Nitrozellulose-Membranfiltern mit einer Porengröße von 200 mμ gezüchtet wird. Die Membranfilter werden hierzu so über mit flüssigem Nährmedium (Rinderleber-Peptonwasser) gefüllten Trichtern oder Schalen angebracht, daß sie von dem Nährsubstrat durchtränkt werden. Sodann wird die Oberfläche der Filter mit Vibrio-fetus-Kultur beimpft. Nach 3-tägiger Bebrütung bei 37°C in normaler Atmosphäre werden die Filter abgehoben und in physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen. Die so gewonnene Vibrionen-Suspension ist nach Angabe von MUNDT weitgehend frei von Nährsubstrat-Bestandteilen; das umständliche Waschen und Reinigen der Mikroben kann deshalb ohne Nachteil unterbleiben.

HANSEN, PRICE u. CLEMENTS (51) modifizierten die Thioglycolat-Bouillon nach Brewer und hatten mit ihr bei der Kultivierung von Vibrionen gute Erfolge, da sich die sehr empfindlichen Keime darin ohne Schwierigkeit fortzüchten ließen. Auch PRICE u. Mitarbeiter (113) beobachteten, daß Vibrio fetus in diesem Medium, das 72 Stunden lang bei 37°C in Gegenwart von 5 - 10 % CO_2 bebrütet wurde, gut gedieh. MORGAN (95) verwendete Na-Thioglycolat-Bouillon mit gutem Erfolg vor allem zur Aufbewahrung von Laboratoriums-Kulturen.

HUBRIG (58) verwendete auch das Blutwasser-Nährmedium nach Müller (1/3 defibriniertes Pferdeblut + 2/3 Aqua dest.), das nach seiner Erfahrung in vielen Fällen ein besseres Wachstum der Vibrionen als in Leberbouillon ergab. Der hohe Blutgehalt schien hemmend auf die Begleitkeime einzuwirken, ohne die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Vibrionen ungünstig zu beeinflussen. Nach 3 - 4tägiger Bebrütung in diesem Medium kam es zu einer Agglutination der Vibrionen; diese agglutinierten Formen ließen sich auf festen Nährmedien nicht mehr weiter züchten. Nach etwa 8 Tagen lösten sich die agglutinierten Haufen wieder in einzelne, gut bewegliche Vibrionen auf, die dann für eine Zeit von 4 Monaten im gleichen Medium lebens- und vermehrungsfähig gehalten werden konnten.

f) Halbflüssige und halbfeste Nährmedien :

Ein sehr gutes Nährsubstrat für die Kultivierung und Aufbewahrung von Vibrio fetus ist nach HUDDLESON u. FORREST (63) das Bacto-Thiol-Medium der Difco Laboratories Inc., Detroit, Mich. (26), das den Vibrionen durch sein O_2-Redox-Potential und den Gehalt von 0,1 % Agar ein günstiges Wachstumsmilieu schafft. Nach Angabe der Autoren blieben Vibrio-fetus-Kulturen in diesem Medium wenigstens 150 Tage lang ohne Überimpfung lebens- und vermehrungsfähig. Auch BRYNER u. FRANK (19) und OLDS (105) empfehlen für die Züchtung der Vibrionen das Thiol-Medium, in dem Vibrio fetus nach BINNS u. FINCHER (11) ein charakteristisches Wachstum dicht unter der Oberfläche des Mediums zeigt, das sich von einem zentralen Punkt aus fächerförmig oder auch regenschirmartig ausbreitet. ROLLE u. MUNDT (131) bebrüteten Vibrio-fetus-Kulturen in Thiol-Medium 3 - 4 Tage lang bei 37°C unter normalen atmosphärischen Verhältnissen; sie verschlossen die Kultur-Röhrchen mit paraffinierten

Stopfen, um eine Austrocknung zu verhindern. Bereits nach 2tägiger Bebrütung war ein Wachstum der Keime von zartflockigem Aussehen dicht unterhalb der Oberfläche des Mediums makroskopisch erkennbar, wo dann nach 4tägiger Bebrütung eine 0,5 - 1,0 cm dicke, schleierartige Trübung auftrat, die beim Schütteln der Röhrchen in wolkige Schlieren überging. Unterhalb der Wachstumszone blieb das Medium klar. Die Subkultivierung der Vibrionen in Thiol-Medium gelang unbegrenzt. Zwischen in normaler und in mit CO_2 angereicherter Atmosphäre bebrüteten Vibrio-fetus-Kulturen in Thiol-Medium war kein Unterschied hinsichtlich der Dichte des Wachstums, der Motilität und der Morphologie ersichtlich. BRYNER u. FRANK (19) und STEGER (146) bebrüteten die Kulturen in Thiol-Medium 3 - 4 Tage lang in einer Atmosphäre, der sie 10 % CO_2 zugesetzt hatten. STEGER (146) beschreibt das Wachstum von Vibrio fetus in Thiol-Medium als eine nach 4tägiger Bebrütung im oberen Viertel des Mediums schwimmende, haarknäuelartige Trübung. Bei 20°C aufbewahrte und vor UV-Strahlen geschützte Vibrio-Kulturen konnten bis zu 80 Tagen lebensfähig erhalten werden, wenn das Medium vor Austrocknung bewahrt wurde. HUGHES u. GILMAN (67, 65, 66) verwendeten zur Subkultivierung von Vibrio fetus das originäre Thiol-Medium; Untersuchungsmaterial (Sperma etc.) züchteten sie jedoch mit gutem Erfolg in Thiol-Medium an, dessen Agar-Gehalt sie durch Zusatz von 4,0 g Agar pro 1000 ml Medium auf 0,5 % erhöhten, wodurch es eine halbfeste Konsistenz erhielt. Sie verimpften das Material etwa 2-5 cm tief in das in Röhrchen zu 5 cm Höhe abgefüllte Medium. Nach 3-8tägiger Bebrütung bei 37°C in einer 10 % CO_2-Atmosphäre konnte das Wachstum der Vibrionen in der Tiefe des Mediums festgestellt werden. Auch GRÖGEL (50) und WEIKL (175) erhöhten den Agar-Anteil im Thiol-Medium auf 0,4 % und 0,5 %. Sie verwendeten das Medium in dieser Form zur Anreicherung

von Vibrionen im Untersuchungsmaterial. Sie hatten die angegebene Konsistenz in der Annahme gewählt, daß sich die Begleitkeime nur im Bereich des seitlichen Impfstiches vermehren, die Vibrionen aber durch ihre starke Beweglichkeit in dessen Umgebung ausschwärmen würden und dadurch ziemlich rein für die Isolierungsversuche auf festen Nährmedien zu gewinnen wären. Diese Hoffnung erfüllte sich jedoch nicht, da sich die Vibrionen vorwiegend im Bereich des Impfstiches vermehrten, wohingegen die beweglichen Begleitbakterien, vor allem Proteus- und Pseudomonas-Arten, in dessen Umgebung vordrangen.

RISTIC u. MORSE (124) und REICH u. Mitarbeiter (119) benutzten zur Kultivierung und Aufbewahrung von Vibrionen die Albimi-Brucella-Bouillon (Albimi Laboratories Inc., Brooklyn 2, N. Y.) mit einem Agar-Gehalt von 0,1 %, in der diese Mikroben nach Angabe der Untersucher gut gediehen.

WILSON u. McDIARMID (178) züchteten Vibrio fetus mit gutem Erfolg auch in einer halbfesten Nährbouillon mit 0,3 % Agar-Anteil, wobei sie die Kulturen 3 - 6 Tage bei 37°C in einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre bebrüteten.

STEGER (146) gelang die Züchtung der Vibrionen auch in Nährbouillon mit 0,1 % Agar-Anteil und 10 % Rinderblut-Zusatz, wenn die Kulturen 4 Tage lang bei 37°C bei 20 % Luftdruck-Verminderung und 10 % CO_2-Zugabe bebrütet wurden. Vibrio fetus wuchs im oberen und mittleren Drittel dieses Mediums in Form einer hellgrauen Scheibe.

SCHNEIDER u. MORSE (134) berichteten, daß die Vibrionen sehr gut in Thioglycolat-Medium mit 0,1 % Agar-Gehalt und in Albimi-Brucella-Bouillon, deren Agar-Konzentration auf 0,5 % erhöht worden war, gezüchtet werden konnten.

ROLLE u. MUNDT (132) untersuchten die Brauchbarkeit folgender Nährmedien für die Kultivierung von Vibrio fetus:

1. Na-Thioglycolat-Medium (Rinderherzbouillon + 10 γ/ml Na-thioglycolat + 0,1 % Agar), 2. Eigelb-Bouillon (Rinderherzbouillon + 2 Eigelb/l + 0,1 % Agar), 3. Glutathion-Bouillon (Rinderherzbouillon + 50 γ/ml Glutathion + 0,1 % Agar). Die Untersucher berichteten, daß Vibrio fetus in allen drei Medien ein gleich gutes Wachstum erkennen ließ, das dem in Thiol-Medium nicht zurückstand. ROLLE u. MUNDT teilten weiterhin mit, daß sie durch Zusatz von 100 /ml Streptomycin zu halbflüssiger Na-Thiolglycolat-Bouillon (frisch hergestellte Streptomycin-Lösung wurde dem Medium nach der Sterilisation desselben zugesetzt) das Wachstum von Begleitkeimen (E. coli, Mesentericus, Micr.aureus) völlig unterdrücken konnten; die Vibrionen dagegen sollen sich ungehindert entwickelt haben und 10 Tage lang vermehrungsfähig geblieben sein. Durch Penicillin-Zusatz bis zu 1000 I.E./ml wurde zwar die Entwicklung von Mesentericus-Keimen und Mikrokokken gehemmt, gleichzeitig aber auch das Wachstum der Vibrionen gestört. HUBRIG (58) konnte diese Angaben nicht bestätigen, denn trotz unterschiedlich hoher Streptomycin-Zusätze zu halbflüssigen Nährmedien beobachtete er nur in einem Falle Vibrionen-Wachstum, obwohl die Streptomycin-Konzentration bis auf 50 γ /ml Nährmedium gesenkt worden war, (= Hälfte der von ROLLE u. MUNDT angegebenen Menge), bei der bereits die Begleitkeime wieder ungehindert gediehen.

HUBRIG (58) berichtete, daß sich zur Kultivierung von Vibrio fetus nach seinen Erfahrungen am besten Leber-Leberbouillon mit 0,1 % Agar-Gehalt (pH 7,4) eignete, in der die Vibrionen nach 1 - 2tägiger Bebrütung bei 37°C eine etwa 1 cm dicke Wachstumszone bildeten, die dicht unter der Oberfläche des Nährmediums begann und grau-wolkig getrübt war. Unterhalb der Wachstumszone war das Nährmedium nur wenig getrübt. Bei der Überimpfung von Vibrio-Kulturen von Leber-Leberbouillon auf Leber-Leberbouillon konnte bereits nach 16-stündiger Bebrütung ein

dichtes Keimwachstum mit starker Beweglichkeit der Vibrionen festgestellt werden. Demnach scheint die Vermehrung der Vibrionen bei einer Gewöhnung an das Nährmedium rascher vonstatten zu gehen. Es gelang HUBRIG, Vibrio fetus-Kulturen in diesem Nährmedium während einer Zeit von 4 Monaten bei 37°C lebensfähig zu halten. Nach der Beobachtungszeit wiesen die Keime noch eine hohe Beweglichkeit auf und waren ohne Schwierigkeit weiter zu züchten. Auch Na-thioglycolat-Bouillon mit 0,1 % Agar-Anteil eignete sich für die Züchtung der Vibrionen, ließ jedoch keinen Vorteil gegenüber der Leber-Leberbouillon erkennen. In diesem Nährmedium bildeten die Vibrionen 1 - 2 cm unter der Oberfläche eine nach oben hin scharf abgesetzte, graunebelige, etwa 7 mm dicke Wachstumszone, die nach unten zu undeutlich auslief. HUBRIG schien dies Wachstum für Vibrionen-Kulturen typisch zu sein. VOIGT (170) verwendete für die Primärkultur von Vibrio fetus Leber-Leberbouillon mit einem Agar-Gehalt von 0,3 - 0,5 % in Anlehnung an den Leberbrühagar nach PLASTRIDGE (108). Nach der Beimpfung mit Untersuchungsmaterial (fetaler Mageninhalt usw.) bebrütete er die Medien 6 - 8 Tage lang bei 37°C und achtete besonders auf fahnenartiges Wachstum dicht unter ihrer Oberfläche.
GAUTHIER u. CEVÉ (45) geben die Zusammensetzung zweier von ihnen bei der Züchtung von Vibrionen erprobter Nährmedien wie folgt an:

I.	Rinderherzbouillon	1000,0 ml
	Agar-Agar	1,0 g
	lösliche Stärke	1,0 g
	Cystein	0,2 g
	p-Aminobenzoesäure	0,025 g; pH 7,3;
II.	Rinderherzbouillon	1000,0 ml
	Agar-Agar	1,0 g
	Hefe-Autolysat	5,0 g
	lösliche Stärke	1,0 g

Ac. thioglycolat	0,5 g
Cystein	0,5 g; pH 7,3.

Beide Medien wurden 30 Minuten lang bei 115°C sterilisiert. Sollten diese Nährmedien mit Infektionsmaterial beimpft werden, so wurde ihnen vorher noch Reduktase zugesetzt. Nach Angabe der Autoren sollen nur die Primärkulturen in einer mit 10 % CO_2 angereicherten Atmosphäre bebrütet werden. und zwar 2 - 3 Tage lang. Reinkulturen von Vibrio fetus und verwandten Vibrionen brauchen in den beschriebenen Medien höchstens alle 3 Wochen in frisches Nährsubstrat übergeimpft zu werden.

VINCENT u. Mitarbeiter (166) züchteten Vibrionen in tiefentsäuerter Gelatine, die 0,2 % Glucose enthielt.

DEDIÉ (23) stellte fest, daß unerhitztes Rinderserum Stoffe enthält, die das Wachstum von Vibrio fetus in der Tiefe eines halbfesten Nährmediums begünstigen.

g) Feste Nährmedien:

Allgemein wurde festgestellt, daß sich die Vibrionen in flüssigen oder halbflüssigen Nährmedien am besten entwickeln, dennoch ist die Verwendung fester Nährböden für die Isolierung der Keime in Reinkultur aus verunreinigten Kulturen in flüssigen, halbflüssigen oder halbfesten Medien sowie aus Untersuchungsmaterial unumgänglich. Hierzu benutzen die meisten Autoren bluthaltige Nährmedien, da sie beobachtet hatten, daß die Vibrionen auf solchen Medien gut gedeihen.
TERPSTRA u. EISMA (157, 154) züchteten die Vibrionen auf 10 %igem Rinderblutagar (1000 ml Rindfleischwasser + 15 g Agar + 10 g Pepton + 5 g Na Cl; nach dem Autoklavieren und der Abkühlung des Nähragars auf 52° C wird diesem 10 % defibriniertes Rinderblut zugesetzt und das Medium in Schalen gegossen; pH-Endwert = 7,2), dem sie 0,3 % Thiol als weiteren Wachstumsanreiz für die Vibrionen

zusetzten, und auf 10 %igem Rinderblut-Schokolade-Agar (gleiche Zusammensetzung wie der Frischblutagar, doch wird das Medium nach dem Zusatz des Blutes nochmals auf 80°C erhitzt; pH-Endwert = 7,2; 0,3 % Thiol-Zusatz). Im Schokolade-Blutagar darf die Katalase-Aktivität des Blutes nicht mehr nachweisbar sein. Der Agar-Gehalt wurde bei beiden Medien später auf 2 % erhöht (173). Frische Platten wurden zur Trocknung und Sterilitätskontrolle 24 - 28 Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend bei + 4 - 7°C aufbewahrt. Beimpfte Platten wurden 4 Tage lang bei 37°C in einer mit 10 % CO_2 angereicherten Atmosphäre bebrütet und zeigten danach ein üppiges Wachstum der meisten pathogenen Vibrio-Arten. Unterdruck war bei der Bebrütung der Blutmedien nicht notwendig. FRANK (40) fügte zu 10 %igem Rinderblutagar ebenfalls 0,3 % Thiol zu, da nach seinen Beobachtungen das Wachstum der Vibrionen durch den Thiolzusatz verbessert wurde. Auch LAWSON u. McKINNON (79, 81) züchteten Vibrio fetus auf 10%igem Rinderblutagar und 10%igem Rinderblut-Schokolade-Agar (1000 ml Aqua dest. + 15 g pulv. Davis-Agar + 5 g Lemco-Rindfleischextrakt + 10 g Bacto-Pepton + 5 g NaCl; pH 7,6; 10 % defibriniertes Rinderblut wurden dem in Roux-Flaschen abgefüllten Nähragar entweder sofort oder erst nach der Abkühlung zugesetzt). Weiterhin verwendeten sie Schrägagar, dem sie nach der Beimpfung pro Kultur-Röhrchen 2 ml defibriniertes Rinderblut zufügten. Auf der Oberfläche all dieser Medien war nach 3-tägiger Bebrütung unter 10%iger CO_2-Spannung ein reichliches Wachstum der Vibrionen zu beobachten.

MORGAN (95) erhielt ein gutes Wachstum der Vibrionen in Primär-Kulturen auf Nähragar mit Zusatz von Thioglycolat und 10 % Ochsen- oder Schafblut (1000 ml Aqua dest. + 25 g Agar + 10 g Lemco-Rindfleischextrakt + 10 g Evans-Pepton + 5 g NaCl + 1 g Na-thioglycolat; pH 7,6; nach 15-minütiger Sterilisation bei 121°C und Abkühlung auf 56°C

werden 10 % Ochsen- oder Schafblut zugefügt), die bei 37°C unter 10%iger CO_2-Spannung 6 Tage lang bebrütet wurden. Diese Zeit war notwendig, da die Platten nach 3 Tagen noch kein, nach 6 Tagen aber gutes Vibrionenwachstum zeigten. STEGER (146) benutzte zur Reinzüchtung und Antigen-Gewinnung 50%igen Rinderblut-Schokolade-Agar (1,7 % Agar enthaltende Rindfleischbouillon von pH 7,5 wird in Roux-Flaschen oder Kolle-Schalen gegossen, 30 Minuten lang bei 110°C sterilisiert, nach Abkühlung auf 50°C Zugabe von 50 % defibriniertem Rinderblut, anschließend 10 Minuten lang im strömenden Dampf erhitzen und die Schalen dann 12 Stunden lang bei 37°C trocknen lassen). Nach der Beimpfung wurde das Medium in Behältern unter 10%iger CO_2-Spannung während 4 Tagen bei 37°C bebrütet, wobei eine Luftdruckverminderung nicht notwendig war. Am ersten Bebrütungstag wurde das Medium mit seiner Oberfläche nach oben zeigend gehalten, während der anschließenden 3 Tage jedoch "hängend" bebrütet. Dieser Nährboden bot nach Mitteilung STEGERS optimale Voraussetzungen für ein üppiges Wachstum der Vibrionen, hatte aber den Nachteil, daß sich eventuelle bakterielle Verunreinigungen nicht durch Hämolyse anzeigten. HARMS u. HÖRTER (52) und ROLLE u. MUNDT (131) berichteten im Gegensatz zu den anderen Autoren, daß Vibrio fetus auf 10%igem Rinderblutagar (2% Agar-Gehalt) nach 4 - 6 tägiger Bebrütung unter erhöhter CO_2-Spannung meist nur ein spärliches, oft aber überhaupt kein Wachstum zeigte. HUBRIG u. Mitarbeiter (59, 62) bedienten sich für die Anzüchtung von Untersuchungsmaterial eines 20%-igen Pferdeblutagars (2,5 % Agar-Gehalt; pH-Wert vor dem Sterilisieren 7,8), auf dem sie nach 3tägiger Bebrütung bei 37°C in einer 10 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre unter Aufrechterhaltung geringen Unterdruckes ein sehr gutes Wachstum von Vibrio fetus und anderer Vibrionen beobachten konnten. GRÖGEL (50) verwendete zur Vibrionen-Züchtung 10 %-igen Pferdeblutagar und 10%igen Pferdeblut-Schokolade-Agar (je 2,5 % Agar-Gehalt; pH vor dem Sterilisieren 7,6)

wobei er letzterem noch 1 % Thiol zufügte, und erzielte auf ihnen nach 3tägiger Bebrütung bei 37°C in einer 15 - 20 %igen CO_2-Atmosphäre ein geringes bis starkes Keimwachstum, das von der Stärke der Aussaat abhängig war, VOIGT (168) benutzte Traubenzucker-Blutagar, Einfachblutagar, Kochblutagar, Serumagar, Schafblutagar und einfachen Nähragar, wobei er auf den beiden letztgenannten Nährböden das schwächste Wachstum der Vibrionen beobachtete. Nach DEDIÉ u. VOIGT (25) sind die Fortner-Platte sowie Blut-, Röstblut- und Serumagar zur Vibrionenzüchtung gut geeignet, wenn die Nährböden in dicker Schicht und ziemlich weich gegossen werden. Die Platten sollen zur Beimpfung nicht vorgetrocknet werden (Gegensatz zu den Mitteilungen von TERPSTRA u. EISMA und STEGER). Die beimpften Platten wurden in Exsikkatoren bebrütet, die auf 4 mm Hg Luftdruck evakuiert und dann zu 15 % ihres Volumens mit CO_2 gefüllt waren. Nach DEDIÉ (23) wird das Wachstum von Vibrio fetus auf der Oberfläche fester Nährmedien durch den Zusatz gewaschener Blutkörperchen begünstigt. Auf einfachem Trypsin-Pepton-Kochsalz-Agar (pH 7, 0) mit einem Zusatz von ca. 1 % hämolysierten oder erhitzten, gewaschenen Blutkörperchen lassen sich die Vibrionen, vor allem wenn sie an das Wachstum auf künstlichen Nährmedien gewöhnt sind, im sauerstoffarmen Milieu sehr gut kultivieren. Andere sauerstoffreduzierende Substanzen, wie Hirnextrakt, Natriumsulfit, Na-thioglycolat u. a. m., wirkten ähnlich, aber nicht so zuverlässig. Frisch- und Röstblutagar ist nach DEDIÉ auch gut geeignet für die Züchtung von Vibrio fetus aus Untersuchungsmaterial.
PLASTRIDGE u. Mitarbeiter (111), HUGHES u. GILMAN (67) und FLORENT (35) berichteten, daß sich Vibrio fetus gut auf Bacto-Thiol-Medium (Difco), dem 1, 9 % Agar zugesetzt worden war, kultivieren ließ. FLORENT (36) verwendete später für Primärkulturen ein Medium folgender

Bacto-Thiol-Medium (Difco)	25,0 g
Glutathion	0,05 g
Agar-Agar	19,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml; pH 6,8.

Das Medium wurde in Kulturröhrchen mit Schraubverschluß abgefüllt, 15 Minuten lang bei 121° sterilisiert und in Schräglage erstarren gelassen. Vor der Beimpfung wurde zu jedem Röhrchen 1 ml gewöhnliche Bouillon zugefügt, die 10 % defibriniertes Guinea-Taubenblut enthielt. In diesem Medium, das frisch bereitet verwendet werden soll, war das Wachstum der Vibrionen schon nach 2tägiger Bebrütung nachweisbar. Ein wesentlicher Vorteil dieses Mediums war, daß die Vibrionen auf ihm auch unter aeroben Verhältnissen sehr gut gediehen. ROLLE u. MUNDT (132) erzielten auf Bacto-Thiol-Medium mit 2% Agar-Gehalt ebenfalls ein gutes Wachstum von Vibrio fetus. Auf einfachem Nähragar konnten sie kein, auf Nathioglycolat-Nährboden (2 % Agar) nur schlechtes Wachstum der Vibrionen beobachten. Nach HANSEN u. Mitarbeitern (51) hingegen ließ sich Vibrio fetus auf festem Na-thioglycolat-Medium in zufriedenstellender Weise kultivieren. STEGENGA (143) züchtete die Vibrionen auf 3%igem Schrägagar, dessem Kondenswasser einige Tropfen defibriniertes Pferdeblut zugesetzt waren, und mit gutem Erfolg auf Leberinfus-Agar. Nach 3-5tägiger Bebrütung im Zeißler-Topf oder im CO_2-Schrank bei 37°C wurden die Kulturen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nach 7 Tagen subkultiviert.

REICH u. Mitarbeiter (119) sowie RISTIC u. MORSE (124) verwendeten zur Vibrionen-Züchtung den Albimi-Brucella-Agar, der zusammengesetzt ist aus:

(pro 1000 ml)		
	Pepton "M"	20,0 g
	Dextrose C.P.	1,0 g
	Hefe-Autolysat	2,0 g
	Na Cl	5,0 g
	$NaHSO_3$	0,1 g
	Agar-Agar	15,0 g; pH 7,0

und auf dem die Vibrionen gut gediehen. RISTIC und MORSE erhöhten den Agar-Gehalt in dem Medium außerdem durch Zugabe von 5, 0 g Agar-Agar auf 2, 0 %.
FIREHAMMER u. MARSH (33) beschrieben eine einfache und wirksame Methode für die Antigen-Gewinnung, bei der sie sich eines Nährmediums bedienten, dessen Grundlage eine Modifikation des "Hormon"-Mediums von HUNTOON (68) war, zu der 10 % Pferde-Serum zugefügt wurden. Die beimpften Nährböden wurden in einer mit 15 % CO_2 angereicherten Atmosphäre bebrütet und zeigten danach ein üppiges Wachstum von Vibrio fetus. Das Nährmedium wurde auch in flüssiger Form benutzt.
Nach CZARNOWSKI (21) eignete sich zur Vibrionen-Züchtung auf festen Nährmedien besonders Leber-Agar mit einem Zusatz von 2 - 3 % Glyzerol und 4 % Glucose (pH 7, 4 - 7, 6); durch Zugabe von 5 - 10 % Meerschweinchenblut konnte das Wachstum noch gesteigert werden.
STEPKOWSKI u. WINIARSKI (148) verwendeten für die Primärkultur von Vibrio fetus 5 - 10 %igen Hammelblutagar (1, 5 % Agar-Gehalt), besser noch gediehen die Vibrionen auf einem Eier-Nährmedium (6 Hühnereier + 50 ml Ringer-Lösung + 0, 1 % Maltose mischen, in Schalen gießen und bei 85° C zum Erstarren bringen). STEPKOWSKI (147) benutzte außerdem ein Eier-Nährmedium (10 Hühnereier + 120 ml Milch bei 85° C in Kultur-Röhrchen erstarren lassen) vorwiegend zur Subkultivierung der Vibrionen. Auch KOSLAK (76) bezeichnet Eier-Nährmedien (Eier-Nährmedium mit 2 %iger Glucose-Bouillon im Verhältnis 3 : 1 gemischt) für diesen Zweck als besonders gut geeignet. Ansonsten züchtete er die Vibrionen auf Nähragar, dem 10 % Rinder-Serum oder 10 % defibriniertes Hammelblut zugesetzt worden waren. NOWAK (104) erzielte das beste Wachstum der Vibrionen auf dem Eier-Nährmedium nach BARTLETT (6 frische Hühnereier mit Alkohol abreiben, durch Gaze filtrieren, mit 50 ml Ringer-Lösung versetzen und in Kultur-Röhrchen bei 80° C erstarren lassen; anschließend nach

dem Erkalten etwas Ringer-Lösung nachfüllen), konnte aber auch auf Glyzerin-Nähragar (2 % Glyzerin und 3 % Agar-Gehalt) ein gutes Gedeihen der Keime beobachten.

h) Brutei - Kulturen:

PLASTRIDGE (107) berichtete über die Adaptation von Vibrio fetus an Hühnerembryonen in 9 - 12 Tage lang vorbebrüteten Eiern. Nach JANSEN u. KUNST (72) gelingt es ohne Schwierigkeiten, Vibrio fetus in der Allantois-Flüssigkeit von 7 - 9 Tage lang bebrüteten Hühnereiern zu züchten, in der bereits 3 Tage nach der Beimpfung der Eier ein üppiges Wachstum der Vibrionen erkennbar ist. WEBSTER u. THORP (174) gelang es ohne weiteres, mehrere Vibrio-fetus-Stämme durch 23 Reihenpassagen in embryonierten Hühnereiern fortzuzüchten, wobei die Pathogenität der Keime für diesen Wirt bestätigt wurde. Die Mortalität der Embryonen belief sich auf 84 % gegenüber einem Schlupf-Ergebnis von nur 3,6 %. Auch FRAS u. Mitarbeiter (43) konnten Vibrio-fetus-Stämme in Hühnerembryonen züchten.

STEGER (146) berichtet, daß nach 12tägiger Bebrütung von Hühnerembryonen, die mit 0,1 ml einer Vibrio-fetus-Suspension (10^{-4} in physiologischer NaCl-Lösung) beimpft worden waren, Vibrionen-Wachstum in der Amnion- und der Allantois-Flüssigkeit auftrat. Diese Embryonen starben am 2., 3. oder 4. Tag post infectionem ab. Die in den Bruteiern nachgewiesenen Vibrionen ließen sich in 4 Wechselpassagen zwischen Ei und Thiol-Medium lebend erhalten. Bei 2 von 9 Hühnerembryonen, die 48 bzw. 70 Stunden nach der Infektion abgestorben waren, konnten auf dem Allanto-Chorion feine grauweiße, bröckelige bis kalkartige Auflagerungen beobachtet werden, aus denen sich Vibrio fetus in Reinkultur züchten ließ.

i) Reinzüchtung von Vibrio fetus;
Selektiv-Medien:

Der mikroskopische und kulturelle Nachweis von Vibrionen in den genitalen Sekreten männlicher und weiblicher Rinder sowie in Abortus-Material bereitet heute im allgemeinen keine Schwierigkeiten mehr. Problematisch ist jedoch die Isolierung der Vibrionen in Reinkultur geblieben, die für die Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion unerläßlich ist. Die zumeist in großer Zahl im Untersuchungsmaterial enthaltenen unspezifischen Bakterien überwuchern in den Kulturen oft die feinen und nur langsam wachsenden Vibrionen, deren Wachstum insbesondere durch E. coli und Keime der Mesentericus-Subtilis-Gruppe gehemmt wird. Sehr nachteilig wirkt sich auch das Schwärmen von Proteus vulgaris und anderen beweglichen Bakterien aus. Viele Autoren berichten, daß sie oft keine exakte Diagnose stellen konnten und eine wiederholte Untersuchung notwendig war, weil die Oberfläche der Nährmedien von Verunreinigungskeimen überwuchert wurde. GÖTZ (48) gelang die Reinzüchtung der Vibrionen nur in 9 von 26 vibrio-positiven Fällen; sie führte nicht zum Erfolg, wenn in der Primärkultur nur wenig Vibrionen enthalten waren. GRÖGEL (50) konnte die nachgewiesenen Vibrionen infolge des hohen Gehaltes an Begleitkeimen - insbesondere Proteus vulgaris - nur in 14 von 96 Fällen reinzüchten (= 14,6 %). Der Grund dafür lag nicht in einem geringen Wachstum der Vibrionen in den Primär- oder Subkulturen, sondern ausschließlich in der Überwucherung der zur Reinzüchtung verwendeten Nährmedien (Blutagar- und Schokoladeblutagar-Medien) durch Proteus. Der Versuch, das Wachstum der Begleitkeime durch verschiedenartige Vorbehandlung und Zusätze zu den Nährmedien zu hemmen oder zu unterdrücken, hatte keinen Erfolg.
Die verschiedenartigsten Versuche sind unternommen worden, um eine für die Reinzüchtung der Vibrionen geeignete Methodik und ein Nährmedium mit optimaler Selektivität zu

entwickeln.
GAUTHIER u. CHEVÉ (45) bewahrten Primärkulturen (angelegt in halbflüssigen Medien; siehe S. 76) 3 Wochen lang auf, da sie wiederholt beobachtet hatten, daß ein mäßiges Wachstum der Begleitbakterien das der Vibrionen nicht übermäßig beeinträchtigte; eigenartigerweise hatte nach dieser Zeit sogar der relative Anteil der Vibrionen an der Bakterienflora oft zugenommen (bis zu 75 %), so daß sich die Aussichten für die Gewinnung von Reinkulturen erheblich verbessert hatten. Die Isolierung der Vibrionen aus den Primärkulturen war immer problematisch, auch dann, wenn relativ viel Vibrionen in ihnen vorkamen; sie gelang im allgemeinen, wenn sich der Anteil der Vibrionen an der Gesamtflora auf 60 - 70 % belief. Es erwies sich stets als vorteilhaft, wenn die Primärkulturen in jedem Fall erst subkultiviert wurden, ehe die Reinzüchtung der Vibrionen versucht wurde. Durch die Verwendung von Filterkerzen konnten bereits relativ saubere Primärkulturen erhalten werden. Auch JACOTOT u. VALLÉE (71) empfehlen die Filtration vibrio-verdächtigen Untersuchungsmaterials durch L_3-Filterkerzen, da hierdurch die Isolierung der Vibrionen aus den Primärkulturen erleichtert wird.

HUBRIG u. Mitarbeiter (62) zentrifugierten die Präputial-Spülproben von Bullen (siehe S. 37 u. 38) und erreichten dadurch auf Blutagar-Platten (20 % defibriniertes Pferdeblut, 2,5 % Agar; pH etwa 7,2), auf die sie das Material dann verimpften, das Wachstum von Einzelkolonien. Auf diese Weise konnte Vibrio fetus gleich aus der Primärkultur isoliert werden. Befanden sich jedoch Proteus vulgaris oder Pseudomonas aeroginosa in den Spülproben, so wurden die Platten von diesen Keimen, zu deren Wachstumshemmung kein geeignetes Mittel gefunden werden konnte, überwuchert. Auch DEDIÉ (23) klärte die Spülproben durch Zentrifugieren vor, ehe er sie anzüchtete.
SCHNEIDER u. MORSE (134) prüften die Toleranz der Vibrionen gegenüber Galle, indem sie zu halbfestem Albimi-

Brucella-Nährmedium (0,5 % Agar-Gehalt) Ochsen-Galle in verschiedenen Mengen zusetzten. Sie stellten fest, daß die meisten Vibrio-fetus- und anderen, nicht identifizierten Vibrionen-Stämme gut in Medien wuchsen, die bis zu 10 % Galle enthielten. Apathogene Stämme gediehen bei gleicher Galle-Konzentration im Medium im allgemeinen schlechter als die Vibrio fetus-Stämme. Somit erwies sich der Zusatz von Galle zu Nährmedien als eine Grundlage für die Entwicklung eines Selektiv-Mediums für Vibrio fetus.

TERPSTRA u. EISMA (157) berichteten, daß Versuche, feste Nährmedien (Blut- und Schokoladeblutagar) den Erfordernissen entsprechend durch Zusätze von Bakteriostatika so herzustellen, daß das Wachstum der Begleitflora gehemmt wird und gleichzeitig das der Vibrionen unbeeinflußt bleibt, zu keinen befriedigenden Ergebnissen führten. Die Autoren untersuchten die Wirkung von Methylviolett, Kristallviolett, Gentianaviolett, Thionin, Trypaflavin, Malachit, Wismutnitrat, Na-bezenelit, Kaliumtellurit, Thalliumazetat, Taurochlorat, Galle und Brillantgrün und stellten dabei fest, daß fast alle diese Bakteriostatika das Wachstum der Vibrionen in solch einem Ausmaß hemmten, daß es nutzlos war, sie den Nährmedien zuzusetzen. Lediglich ein Zusatz von Galle (1 : 75) und von Brillantgrün (1 : 500000) zu den Nährmedien erwies sich als nützlich, wenn die Begleitflora nicht zu stark war, da deren Wachstum dann gehemmt wurde, das der Vibrionen jedoch unbeeinflußt blieb. Später empfahl TERPSTRA (154), den Blutagar-Platten 1 : 1000 Alkylarylsulfat ("Santomerse") und 0,5 % Äskulin zuzusetzen und die Platten vor der Beimpfung gut zu trocknen. ANON (6) verwendete ein Blutagar-Medium, das 0,005 % Glutathion, 0,5 % Äskulin und 0,1 % Alkylarylsulfat enthielt.

STEGER (146) beschrieb ein Selektiv- und Differenzierungs-Nährmedium, das sich nach seinen Angaben für die Isolierung von Vibrio fetus aus verunreinigtem Untersuchungsmaterial gut bewährt hat und zusammengesetzt ist aus

(Rezept für etwa 12 Petrischalen):

Rindfleisch-Bouillon	270,0 ml
Agar-Agar	6,0 g
Äskulin (Merck)	0,9 g
Natriumrizinoleat	0,525g

Die Substanzen werden in der Bouillon unter Erwärmen dieser bis auf 80° C gelöst. Anschließend werden dem 30 Minuten lang bei 110° C sterilisierten Medium nach dessen Abkühlung auf 50° C 30 ml defibriniertes Rinderblut zugesetzt. Dann wird das Medium in Petrischalen gegossen, nach dem Erstarren bei 37° C getrocknet und anschließend bei + 4° C aufbewahrt.

Die beimpften Platten wurden 4 Tage lang bei 37° C in Vakuum-Exsikkatoren bei um 20 % verringertem Luftdruck und 10 %iger CO_2-Spannung bebrütet. Bei manchen Vibrio-fetus-Stämmen lag das Unterdruck-Optimum sogar unter 10 %. Das Wachstum der verschiedenen Keimarten auf diesen Platten wird wie folgt angegeben:

Vibrio fetus: kleine, tautropfenartige, scharfrandige Kolonien mit konvexer, glasig glänzender Oberfläche; Nährbodenfarbe unverändert blauviolett, gelegentlich fraisefarben;

Pseudomonas aeroginosa: wächst mit blaugrün glänzender Oberfläche; Nährbodenfarbe unverändert;

Corynebacterium pyogenes: wird vollständig gehemmt;

Brucella abortus: wird vollständig gehemmt;

Salmonella abortus ovis: runde, mattglänzende Kolonien; Nährbodenfarbe unverändert;

Proteus vulgaris: braun bis olivgrün gefärbte, glänzende bis matte, runde, scharfrandige Kolo-

nien; kein Schwärmen, also keine Terrassenbildung; Nährbodenfarbe im allgemeinen konzentrisch um die Kolonien bräunlich, mitunter aber hellbräunlich bis gelblich (Äskulin-Spaltung) verfärbt.

Jede Charge dieses Selektiv-Mediums sollte auf Elektivität für Vibrio fetus geprüft werden, indem eine Platte mit einem Vibrio-fetus- und einem Proteus-Stamm beimpft und nach 4-tägiger Bebrütung beurteilt wird.

ROLLE u. MUNDT (131) teilten mit, daß durch den Zusatz von 100 γ/ml Streptomycin zu halbflüssiger Na-thioglycolat Bouillon das Wachstum von Begleitkeimen (E. coli, Mesentericus, Micr. aureus) völlig unterdrückt wurde, während sich die Vibrionen ungehindert entwickelten und 10 Tage lang vermehrungsfähig blieben. Ein Streptomycin-Zusatz zu festen Nährmedien in der gleichen Konzentration (100 γ/ml) hatte die gleiche Wirkung, doch bevorzugten die Autoren das halbflüssige Medium, da sich die Vibrionen hierin besser als auf festen Nährmedien entwickelten. Ein Penicillin-Zusatz von 1000 I.E. pro ml Nährmedium hemmte zwar das Wachstum der Verunreinigungskeime, gleichzeitig aber auch das der Vibrionen. Nur in den Fällen, in denen im Impfmaterial reichlich E. coli enthalten war, gediehen die Vibrionen gut, da der antibiotische Effekt des Penicillins durch die Penicillinase der Coli-Keime abgeschwächt oder neutralisiert wird. Auch in einer späteren Veröffentlichung bezeichneten ROLLE u. MUNDT (132) streptomycinhaltige Nährmedien für die Isolierung von Vibrio fetus als gut geeignet. Die Autoren berichteten, daß sie in Rinderleber-Peptonwasser und in halbflüssigem Na-thioglycolat-Medium (0,1 % Agar-Gehalt), wenn diesen Medien Streptomycinsulfat zugesetzt worden war, aus verunreinigtem Untersuchungsmaterial die Vibrionen stets in Reinkultur züchten konnten, da dies Antibioticum das Wachstum aller Begleitkeime völlig hemmte, das der Vibrionen jedoch nicht beeinflußte. Nach Mitteilung

der Autoren mußte das Streptomycinsulfat vor dem Zusatz zu den Nährmedien allerdings besonders präpariert werden, um seinen bakteriostatischen Effekt zu vermindern, da nicht abgeschwächtes Streptomycin die Entwicklung der Vibrionen beeinträchtigte. Die Autoren wogen das Antibioticum in Mengen von 10 mg trocken in Ampullen ab und bewahrten es darin bei Zimmertemperatur auf. Nach 6tägiger Aufbewahrung wurden jeweils 10 mg Streptomycinsulfat in 10 ml Aqua dest. aufgelöst. Diese Stammlösung wurde anschließend noch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, so daß in 1 ml der gebrauchsfertigen Antibiotika-Lösung 100 γ Streptomycinsulfat enthalten waren. Pro 1,0 ml Nährmedium wurde 0,1 ml dieser Lösung, d.h. 10 γ Streptomycinsulfat zugesetzt. Nach Angabe von ROLLE u. MUNDT reichte diese Konzentration aus, das Wachstum der Begleitkeime zu hemmen; die Vibrionen wurden dabei in ihrer Entwicklung nicht beeinträchtigt. War das abgefüllte Streptomycin längere Zeit (mehr als 6 Tage) bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden, so mußte es den Nährmedien in höherer Konzentration zugefügt werden, um das Wachstum der Begleitflora zu unterdrücken; nach 4wöchiger Aufbewahrung war ein Zusatz von 100 γ Streptomycin pro ml Nährmedium erforderlich. Um die richtige Konzentration des Antibiotikums im Nährmedium zu ermitteln, mußte das in der beschriebenen Weise aufbewahrte Streptomycinsulfat periodisch austitriert werden. Vor dem Zusatz zum Nährmedium müssen die Lösungen stets frisch zubereitet werden; sie sind, wenn sie nach ihrer Herstellung im Kühlschrank gehalten werden, höchstens noch 48 Stunden verwendbar.

HUBRIG (58) konnte die Feststellungen von ROLLE und MUNDT nicht bestätigen (siehe S. 79).

VAN WAVEREN (173) teilte mit, daß Vibrio fetus aus verunreinigtem Untersuchungsmaterial ohne Schwierigkeiten in Reinkultur isoliert werden konnte, wenn das Material auf Bacto-Brillant-Green-Agar (Difco) angezüchtet wurde. Dieses Medium hat folgende Zusammensetzung:

(pro 1000 ml)		
	Proteose Pepton Nr. 3	10,0 g
	Bacto-Hefe-Extrakt	3,0 g
	Bacto-Lactose	10,0 g
	Saccharose (Difco)	10,0 g
	Na Cl	5,0 g
	Bacto-Agar	20,0 g
	Bacto-Brillantgrün	0,0125 g
	Bacto-Phenolrot	0,08 g, pH 6,9.

Zur Gewinnung von Vibrio fetus in Reinkultur aus verunreinigten Primärkulturen empfahl FLORENT (36) die Isoliermethode mit der Pasteur-Pipette, die auf der starken Beweglichkeit der Vibrionen beruht. Er erwähnte jedoch, daß dies Verfahren zur direkten Reinzüchtung der Vibrionen aus Mischkulturen nicht ausreicht; es ermöglicht vielmehr eine Anreicherung der Vibrionen, an die sich noch die Züchtung auf festen Nährböden anschließen muß.

Später entwickelte FLORENT (38) ein Selektiv-Medium für die Isolierung von Vibrio fetus aus Untersuchungsmaterial, dessen Zusammensetzung und Herstellungsweise er wie folgt angibt:

peptonisierte Rinderherz-Bouillon	1000 ml
Agar-Agar	20 g.

Die Reaktion dieses Substrates wird bei 55° C auf pH 6,8 eingestellt. Dann wird das Medium zu je 100 ml in Glaskolben abgefüllt und kann ohne Nachteile für 2 - 3 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Vor der Verwendung des Mediums - möglichst am gleichen Tage - werden zu jedem Kolben zugefügt:

Bacto-Thiol-Medium	300 mg
Cystein-HCL	50 mg.

Hierauf wird mit n/1 NaOH-Lösung neutralisiert und im Autoklaven bei 115° C für 15 Minuten sterilisiert. Anschließend werden die Glaskolben mit dem Medium in ein

Wasserbad von 73° C verbracht, in dem man sie einige Zeitlang beläßt. Dann werden zu jedem Kolben 10 ml defibriniertes Hammelblut gegeben, welches vorher 3 Minuten lang im gleichen Wasserbad erwärmt worden war. Nach einminütiger Durchmischung werden zu jedem Kolben nun 1, 25 ml einer Brillantgrün-Lösung (Fa. Grübler, Leipzig) 2, 2 : 1000 zugefügt. Nach gründlicher Durchmischung und einem weiteren kurzen Aufenthalt im Wasserbad wird das Medium so in Petrischalen gegossen, daß die Dicke der Nährbodenschicht etwa 5 mm beträgt.
Das fertige Medium hat nach dem Erkalten ein braunschwärzliches, sehr dunkles Aussehen. Die Endkonzentration des Brillantgrüns im Medium beträgt 1 : 40000.

Vor der Beimpfung sollen die Platten 2 Stunden lang im Brutschrank bei 37° C getrocknet werden.

Nach Angabe FLORENTS wurde das Wachstum gram-positiver und auch einiger gram-negativer Keim-Arten auf diesem Medium vollständig unterdrückt, während sich die Vibrionen ungehindert entwickelten. Das Ausschwärmen von Proteus vulgaris wurde oftmals bis zu 48 Stunden lang verhindert, dann aber begannen diese Keime über die ganze Oberfläche des Mediums zu wuchern. Um die Überwucherung der Kolonien anderer Keim-Arten (Vibrio fetus!) zu verhindern, empfahl FLORENT deshalb, die Proteus-Kolonien spätestens nach 18stündiger Bebrütung der Kulturen auszustechen.

k) Wachstums-Formen von Vibrio fetus auf festen Nährmedien:

Nach BREED, MURRAY u. HITCHENS (13) zeigt Vibrio fetus auf festen Nährmedien ein dürftiges, grauweißes, glänzendes Wachstum. LERCHE (84) sah auf Schrägagar mit Blutzusatz häufig nur eine Trübung oder Flockung des Kondenswassers und am Rande des Nährbodens einen nach

oben ziehenden schmalen, weißen Streifen, der von zäher Konsistenz war. Vielfach beobachtete er aber auch einen zarten Belag oder ausgesprochene Kolonien, die außerordentlich zart, farblos-glasig und nur ausnahmsweise trübe, rund und ganzrandig waren und eine gewisse Ähnlichkeit mit Rotlauf-Kolonien besaßen. Nach BERTHELON u. TOURNUT (9) wachsen die Vibrionen in runden, graublauen, glänzenden, schleimigen Kolonien. PRIER (114) fand auf den Nährböden entweder tautropfen-förmige Kolonien oder einen filmähnlichen Belag. HARMS u. HÖRTER (52) beobachteten rotlauf-ähnliche Kolonien, die bei dichtem Wachstum konfluierten und eine grau-weißliche Farbe annahmen. ROLLE u. MUNDT (131) stellten fest, daß Vibrio fetus auf Rinderblut-Agar farblos wächst oder aber auch kleine Kolonien bildet, die zu hellgelb-weißer Pigmentierung neigen. BINNS u. FINCHER (11) beschrieben die Vibrio-Kolonien als stecknadelkopfgroß, austergrau und leicht über die Nährbodenoberfläche erhaben. Nach MORGAN (95) erfolgt das Wachstum von Vibrio fetus als grauer Filmbelag oder in Form perlgrauer Kolonien mit einem Durchmesser bis zu 2mm; in Subkulturen zeigen sich nur sehr kleine, graue Kolonien.
TERPSTRA u. EISMA (157) beobachteten auf Blutagar gewöhnlich runde, leicht konvexe, reflektierende Kolonien mit einem Durchmesser von wenigen Millimetern, die sich ausdehnten, wenn sie älter wurden, und dabei allmählich ein mehr grau-wolkiges Aussehen annahmen. Diese Vibrio-Kolonien hatten einen unspezifischen Charakter und entwickelten sich wesentlich langsamer als die anderen Mikroorganismen, die aus genitalen Sekreten männlicher und weiblicher Rinder isoliert wurden.

Auf Schokolade-Blutagar geht gleichmäßig ausgesäte Vorkultur von Vibrio fetus nach STEGER (146) als gleichmässig zarter, durchsichtiger, glänzender Rasen auf. Auf Schrägagar mit Rinderblutzusatz wächst Vibrio fetus in Form eines feinen, schmalen, weißen Saumes etwa 1 cm

über dem Kondenswasserspiegel.
LAWSON u. McKINNON (81, 79) beobachteten eine große Verschiedenheit von Vibrio fetus-Kolonien. Sie fanden feine, stecknadelspitz- bis stecknadelkopfgroße Kolonien, die tautropfenartig glänzten und zum Teil auch wie die Kolonien von E. coli und nichthämolytischer Streptokokken aussahen. In Primärkulturen trat das Wachstum der Keime in Form eines hellen Schleiers oder reifartigen Belages auf. Die Autoren beschreiben aber die hauptsächlichste Kolonieform als leuchtende, blaßgraue, halbdurchscheinende, konische Kolonien, die als relativ große und kleine Kolonien auf derselben Platte auftreten können. Mitunter scheint es, als ob mehrere Kolonien zu einer großen schleimigen Masse zusammengewachsen waren; in diesen Fällen ist ein leichtes "Gelieren" auf der Oberfläche des Nährbodens das einzige Anzeichen für das Wachstum von Vibrio fetus.
BRYNER u. FRANK (19) beobachteten gewöhnlich zwei Wachstumsformen von Vibrio fetus:

1. eine deutliche Bildung von runden Kolonien von durchschnittlich 2 mm Durchmesser (punktförmig bis 3 mm), wobei die größeren Kolonien konvex und granulär gestreift waren;

2. ein mehr flächenhaftes Wachstum, das sich gelegentlich über die ganze Oberfläche des Nährbodens erstreckte.

Die pathogenen und apathogenen Vibrionen-Arten konnten im allgemeinen durch die Farbe des Wachstums auf Blutagar unterschieden werden:

Vibrio fetus brachte weißliche Kolonien oder ein flächenhaftes Wachstum mit bläulicher Färbung hervor; die apathogenen Vibrionen (V. bubulus) waren dagegen an einem bräunlichgrünen, flächenhaften Wachstum mit einem metallischen Schimmer und gelegentlicher partieller Hämolyse erkennbar.

In einigen Fällen jedoch konnten die beiden Vibrionen-Arten nur durch die biochemische Prüfung differenziert werden.
HUBRIG (58) beobachtete folgende Kolonieformen, die ihm für das Wachstum der Vibrionen als charakteristisch erschienen:

1. Winzige, nadelstichgroße, runde, glasig durchscheinende, leicht konvexe, glatte und scharf abgesetzte Kolonien mit beginnender, feinster Flockenbildung, die manchmal einen rasenartigen Belag auf dem Nährboden bildeten;

2. graublaue, wolkig getrübte, glatte Kolonien mit feinster Flockenbildung, teils vom Nährboden scharf abgesetzt, teils auch in diesen unscharf übergehend;

3. graugelbgrünliche bis hellockerfarbige Kolonien, die im übrigen wie die unter 2 genannten aussahen;

4. bis zu 3mm im Durchmesser große Kolonien mit hellem durchscheinendem Rand, an den sich ein gelbgrüner, sehr dichter Ring anschloß; der innere Teil der Kolonien war unscharf umrandet, auf der Oberfläche glatt und zeigte eine verwaschene, feinste Flokkenbildung.

Am häufigsten traten die unter 2 bis 4 genannten Formen auf, gleichgültig, ob es sich um Vibrio fetus oder um aus Sperma- oder Präputial-Spülproben von Bullen isolierte Vibrionen handelte. Alle, außer den grau-glasigen Kolonieformen wiesen eine feinste etwas verwaschene Flockung auf. Bei allen Kolonieformen kam es bei genügendem Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens mitunter auch zu einer Art Rasen- oder Schleierbildung mit meist grauweißer bis graugelblicher Farbe. Auf ein und derselben Platte konnten gleichzeitig verschiedene Kolonieformen beobachtet werden, so daß eine Abhängigkeit derselben von den Nährbodenverhältnissen nicht zu bestehen schien. In keinem Fal-

le gelang es, bestimmte Kolonieformen über mehrere Plattenpassagen weiterzuführen, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß der Untersucher nicht von Ein-Zellkulturen ausging; das gleichzeitige Auftreten verschiedener Vibrionen-Stämme konnte also nicht ausgeschlossen werden und erschien als durchaus möglich. Eine wechselseitige Beziehung zwischen den Kolonieformen und der Morphologie der Vibrionen konnte bei phasenkontrast mikroskopischen Untersuchungen von HUBRIG nicht festgestellt werden.

Neuere Untersuchungen von HUBRIG u. RÖHR (59) ergaben, daß die pathogenen Vibrionen (Vibrio fetus; katalasepositiv und H_2S-negativ) auf Blutagar eine charakteristische Kolonieform bildeten. Vibrio fetus wuchs auf 20%igem Pferdeblutagar (2, 5 % Agar-Gehalt; pH vor dem Sterilisieren 7, 8) nach 3tägiger Bebrütung in einer 20 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre in Form kleiner, rotlaufartiger, im Durchmesser 1 - 2 mm großer, leicht konvexer, teilweise unscharf begrenzter Kolonien mit glatter, glänzender Oberfläche. Bei stereo-mikroskopischer Betrachtung zeigten diese Kolonien eine eigenartige feinkörnige Granulierung, durch die sie ein bläulich-weißes oder metallischglänzendes Aussehen erhielten. Apathogene Vibrionen (Vibrio bubulus; katalase-negativ und H_2S-positiv) zeigten zwar ein gleichartiges Wachstum, das jedoch eine gelbgrünliche oder gelbweißliche bis ockerfarbige Tönung aufwies. Diese Feststellungen beruhen auf der kulturellen Untersuchung von 956 Proben (abortierte Rinder-Feten, Plazenten, Cervical- und Vaginal-Schleimproben von Färsen und Kühen, Präputial- und Sperma-Proben von Bullen), bei denen 174 pathogene (katalase-positive) und 184 apathogene (katalase-negative) Vibrionen-Stämme isoliert wurden. Die Beurteilung, um welche Art es sich jeweils handelte, konnte nach den beschriebenen Kolonieformen auf Blutagar bereits in der Primärkultur erfolgen; außerdem wurden die isolierten Vibrionen-Stämme biochemisch, epidemiologisch und im Großtierversuch überprüft. Bei den insgesamt 358 Fest-

stellungen von Vibrionen traten nur in zwei Fällen Zweifel auf, ob es sich nach dem Aussehen der Kolonien um Vibrio fetus oder um apathogene Vibrionen habe handeln können. Bei dem kulturellen Nachweis von Vibrionen auf Blutagar ist es somit möglich, Vibrio fetus von apathogenen Vibrionen mit relativ großer Sicherheit bereits in den Primärkulturen auf Grund des verschiedenartigen Charakters ihres Koloniewachstums zu unterscheiden. HUBRIG u. RÖHR wiesen aber darauf hin, daß diese Unterscheidung erschwert war, wenn es sich um fortlaufend im Laboratorium überimpfte Kulturen handelte oder die Blutagar-Platten einen so hohen Feuchtigkeitsgehalt hatten, daß eine Rasenbildung auftrat. Außerdem schien der Zusatz von Blut anderer Tiergattungen als vom Pferd zum Nährboden ebenso wie die Anwesenheit von Stickstoff in der Wachstums-Atmosphäre an Stelle von CO_2 die Farbunterschiede der Kolonien zu verwischen.

1) Dissoziation von Vibrio fetus:

Über die Dissoziation von Vibrio fetus wurde bisher nur von RISTIC, HERZBERG u. SANDERS (123) genauer berichtet. RISTIC u. Mitarbeiter untersuchten 10 Vibrio-fetus-Stämme verschiedener Herkunft, die 1 - 3 Jahre lang durch monatliche Überimpfung in Albimi-Brucella-Bouillon (0,16% Agar-Gehalt) im Laboratorium gehalten worden waren, eingehend auf ihre kulturellen, morphologischen, biochemischen und serologischen Eigenschaften (4 bovine Stämme aus Feten, 1 boviner Stamm aus Cervical-Schleim, 3 ovine Stämme aus abortierten Feten, 2 Stämme aus dem Blut von Menschen isoliert). Um die Kolonie-Morphologie zu studieren, wurden die Stämme auf Albimi-Brucella-Agar (2% Agar-Gehalt) verimpft und 3 Tage lang bei 37° C in einer 10 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre bebrütet. Die Betrachtung der Kolonien erfolgte mit einem binokularem Mikroskop bei 10 - 20-facher Vergrößerung und unter Anwendung von reflektiertem

Licht, das im Winkel von 45° von unten her durch den Boden der Petrischale einfiel, entsprechend der Methode von HENRY[1]. Weiterhin wurde die Fähigkeit der Kolonien geprüft, Kristallviolett-Lösung 1 : 1000 aufzunehmen, um in Anlehnung an WHITE u. WILSON[2] verschiedene Varianten differenzieren zu können. Die Morphologie der Zellen in den verschiedenen Kolonieformen wurde in nach GRAM gefärbten Objektträger-Ausstrichen bei 900facher Vergrößerung (Ölimmersion) untersucht. Serologische Untersuchungen wurden mit Hilfe des Röhrchen-Agglutinationstests und mit von Kaninchen gewonnenen Antiseren gemacht; außerdem fand der Acriflavin-Test Verwendung.
Alle im folgenden beschriebenen Varianten wurden von den Autoren bei den Kulturen eines bovinen und eines ovinen Vibrio-fetus-Stammes (beide aus abortierten Feten isoliert) beobachtet. Die anderen Stämme zeigten zwei oder mehr dieser unterschiedlichen Varianten.

1. S-Form (smooth): bläuliche, erhabene, durchscheinende, vollständig glattrandige Kolonien mit nur sehr geringer innerer Granulation. Die einzelnen Zellen waren kurz 1,5 - 2,0 μ) und dünn, gebogen, komma- und unvollständig S-förmig.

2. R-Form (rough): diese Kolonien waren im Innern auffallend granuliert und deshalb undurchsichtig und von weißlicher Farbe; sonst ähnelten sie den Kolonien der S-Variante. Die einzelnen Zellen erschienen dicker und fast doppelt so lang wie die der S-Variante.

---

1) B. Henry:
Dissociating in the Genus Brucella;
J. Infect. Diseases, 52 (1933): 374-402

2) P. G. White u. J. B. Wilson:
Differentiation of Smooth and Nonsmooth Colonies of Brucella J. Bact. 61 (1951): 239.

3. CGL-Form (cut glass): bräunlich-grüne, manchmal unregelmäßigrandige Kolonien, die wie geschliffenes Glas mit Fazetten aussahen. Die einzelnen Zellen erschienen als ziemlich lange und spiralige Gebilde, die sich bis halb durch das Gesichtsfeld erstreckten.

Ein gemeinsames Merkmal dieser drei Kolonie-Varianten war ihre weichflüssige Konsistenz, erkennbar an der Neigung der Kolonien, vor der Nadel wegzufließen, wenn sie damit berührt wurden.

4. M-Form (mucoid): diese Kolonien waren größer als die S-, R- und CGL-Kolonien und zeigten einen gelblich-braunen Mittelteil mit hellbräunlicher oder bläulicher Peripherie und manchmal ein strahlenförmiges Aussehen auf der Oberfläche. Die Kolonien hafteten der Nadel an, wenn sie damit aufgepickt wurden. Die einzelnen Zellen ähnelten den Zellen der R-Variante. Diese Kolonie-Variante war von allen die größte.

5. VR-Form (very rough): grauweißliche, opake, flache Kolonien mit manchmal unregelmäßiger Oberfläche. Diese Kolonien behielten ihre Integrität bei, wenn sie mit einer Nadel berührt wurden. Drückte man mit der Nadel auf sie, so erschienen sie als von wachsartiger Konsistenz und zerbrachen in Stücke, die sich in physiologischer NaCl-Lösung nur sehr schwer suspendieren ließen. Auf festem Nährboden war die VR-Variante höchst beständig, gelegentlich trat jedoch nach wiederholter Subkultivierung in Bouillon eine Reversion in die M-, CGL- und S-Variante auf. Die einzelnen Zellen der VR-Variante unterschieden sich von den der S-Variante dadurch, daß sie etwas länger, dicker und gestreckter im Innern granuliert waren.

Auf feuchten, festen Nährmedien wuchsen die CGL-, M- und VR-Formen auch unter normalen atmosphärischen Bedingungen, die S-Formen dagegen gediehen nur in ei-

ner mit etwa 10 % CO_2 angereicherten Atmosphäre. Nach 72stündiger Bebrütung auf gleichen Medien und unter gleichen Bedingungen waren die S-Formen sehr, die CGL-und M-Formen schwach, die VR-Formen nur sehr wenig beweglich. - Nach Einwirkung von wäßriger Kristallviolett-Lösung 1 : 1000 erschienen die Kolonien der VR-Form violett und die der CGL- und M-Formen rotviolett, die Kolonien der S-Form nahmen dagegen keinen Farbstoff auf.

Die im Katalase-Aktivitäts-Test innerhalb von 30 Minuten durch den freigesetzten Sauerstoff verdrängte Wassermenge blieb bei den VR-Formen stets unter 1, 0 Einheiten, wohingegen von dem durch die M-, CGL- und S-Formen freigesetzten Sauerstoff in der gleichen Zeit 28, 0 - 38, 8 Einheiten Wasser verdrängt wurden. Kohlenhydrate (Dextrose, Maltose, Galaktose, Sucrose, Xylose, Rhamnose, Sorbit, Mannit) wurden von keiner Variante angegriffen.

In Normalserum von Rindern agglutinierten die CGL-, M- und VR-Formen bei Verdünnungen von 1 : 40 bzw. 1 : 80 und 1 : 160; die S-Formen dagegen agglutinierten auch bei Verdünnungen von 1 : 10 nicht. - In Acriflavin-Verdünnungen von mehr als 1 : 200 waren die S-Formen inagglutinabel, wohingegen die CGL- und M-Formen in Verdünnungen von 1 : 800 - 1 : 600 und die VR-Formen sogar noch in Verdünnungen von 1 : 3200 - 1 : 6400 agglutinierten. - Die Antigene der S-Varianten agglutinierten mit den Antiseren der S-, CGL- und M-Variante ihres eigenen Stammes, ergaben jedoch keine Kreuz-Reaktionen mit irgendwelchen Antiseren, die gegen die Varianten eines heterologen Stammes hergestellt worden waren. Auf der anderen Seite versagten die S-Antigene, mit den VR-Antiseren der homologen Stämme zu agglutinieren. Ein beträchtlicher Grad der Kreuz-Reaktion ergab sich, wenn die Antigene der Nicht-S-Varianten den gegen irgendeine Variante entweder des homologen oder des heterologen Stammes gerichteten Antiserums ausgesetzt wurden. Die M-Varianten der Stämme (bovin

und ovin) reagierten über Kreuz in fast gleicher Höhe.

Die meisten Kulturen von Laboratoriums-Stämmen enthielten relativ sehr viel Zellen der Nicht-S-Varianten. Diese Stämme waren in Albimi-Brucella-Bouillon mit 0,1 % Agar-Anteil durch monatliche reichliche Überimpfung gehalten worden, wobei nach Ansicht der Autoren eine Selektion mutierter Typen stattgefunden haben könnte, vorausgesetzt, es hätte irgendein selektives Differential zwischen den Varianten bestanden. Das Vermögen der Nicht-S-Varianten, unter normalen atmosphärischen Bedingungen ebensogut zu wachsen wie in einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre, könnte ein Faktor gewesen sein, der eine Selektion der Nicht-S-Formen begünstigte, wodurch diese bei der fortlaufenden Überimpfung und der Lagerung bei Zimmertemperatur gegenüber den S-Formen das Übergewicht bekommen haben würden. Bei Berücksichtigung der langen Perioden der in vitro-Haltung der Kulturen erscheint die Annahme berechtigt, daß die beschriebenen Varianten eher sekundäre Mutanten von Nicht-S-Formen als primäre Varianten der normalen S-Form gewesen sind. Die Autoren planten deshalb, weitere Untersuchungen vorzunehmen. Der Acriflavin-Agglutinabilitäts-Test erschien den Autoren als ein sehr praktisches zusätzliches Verfahren zur Kolonie-Differenzierung. Die Morphologie der Zellen wurde nicht als ausreichendes Kriterium für die Ermittlung der in seiner Kultur vorherrschenden "Variante" angesehen. Die verschwindend geringe Katalase-Aktivität der VR-Varianten wurde von den Autoren als bedeutsam erachtet hinsichtlich einer möglichen Beziehung zwischen den VR-Varianten, die bei "echten" Vibrio-fetus-Stämmen entstanden, und katalase-negativen, "nichtabortiven" Vibrionen.

m) Aufbewahrung und Haltbarkeit von Vibrio-fetus-Kulturen; Lyophilisierung:

SMITH u. TAYLOR (140) beobachteten, daß Primär-Kulturen von Vibrio fetus auf Schrägagar, dem defibriniertes Blut zugesetzt war, unter Umständen bis 139 Tage lang lebensfähig blieben; Subkulturen blieben dagegen nur 2 - 9 Wochen lang am Leben.
HARMS u. HÖRTER (52) konnten Vibrio-fetus-Kulturen, die in steriler Magermilch (pH 7, 4) gehalten worden waren, noch nach 5monatiger (max.) Aufbewahrung im normalen Brutschrank bei 37°C (ohne CO_2-Zufuhr) auf Blutagar weiterzüchten, der bei 37°C in einer 10%igen CO_2-Atmosphäre bebrütet wurde. Noch besser zur Aufbewahrung von Vibrio-fetus-Kulturen eignete sich Leber-Leberbouillon (pH 7, 4), da die Vibrionen in diesem Medium noch nach 9monatiger Aufbewahrung im normalen Brutschrank bei 37°C lebens- und vermehrungsfähig waren. Die Kultur-Röhrchen mußten jedoch mit Paraffin abgeschlossen werden, damit die Kulturen nicht austrockneten.

In Bacto-Thiol-Medium (Difco) bleibt Vibrio fetus nach Angabe von HUDDLESON u. FORREST (63) wenigstens 150 Tage lang ohne Überimpfung lebensfähig. STEGER (146) konnte Vibrio-fetus-Kulturen, die er 81 Tage lang in Bacto-Thiol-Medium bei Zimmertemperatur aufbewahrt hatte, noch ohne Schwierigkeiten in frischem Thiol-Medium und auf festen Nährböden fortzüchten. WARD u. LEE (172) schwemmten Vibrio-fetus-Kulturen von festen Nährböden mit Mineral-Öl ab und beobachteten, daß die Vibrionen darin sowohl bei Zimmer- als auch bei Kühlschrank-Temperatur nahezu 1 Monat lang lebensfähig blieben.
GAUTHIER u. CHEVÉ (45) berichteten, daß die Überimpfung der isolierten Vibrio-fetus-Stämme in frisches Nährmedium (siehe Seite 80) in Abständen von 3 Wochen

ausreichte, die Stämme am Leben zu erhalten, doch sollte besser eine baldige Lyophilisierung der Vibrionen vorgenommen werden.

STOCKTON u. NEWMAN (149) haben die isolierten Vibrionen-Stämme in getrocknetem Zustand aufbewahrt. Zunächst verimpften sie die Stämme in Bacto-Thiol-Medium, in dem sich nach 4tägiger Bebrütung bei 37°C dicht unter der Oberfläche des Mediums eine dichte Wachstumszone bildete, die in sterile Milch abpipettiert wurde. Dann erfolgte die Trocknung dieser Suspension in feuerfesten Glasflaschen in einem trockenen Eis-Alkohol-Bad bei - 73°C und 100 Mikron Druck für 48 Stunden. Die Glasflaschen wurden im Vakuum verschlossen und anschließend bei + 4°C aufbewahrt. Auf diese Weise konnten mehrere Vibrio-fetus-Stämme über einen Zeitraum bis zu 681 Tagen vermehrungsfähig gehalten werden.
MUNDT (101) lyophilisierte in Thiol-Medium gezüchtete Vibrionen-Stämme bei - 73°C, nachdem er sie in eine Schutz-Lösung verbracht hatte, die entweder aus Serum + 7,5 % Glucose oder aus Milch + 7,5 % Glucose bestand. Die lyophilisierten Kulturen wurden bei Zimmertemperatur aufgehoben und blieben vom Zeitpunkt der Trocknung ab 16 Monate vermehrungsfähig. Wie entsprechende Versuche ergaben, gelang die Lyophilisierung auch, wenn die Kulturen weder in Thiol-Medium vorgezüchtet, noch in einer Schutz-Lösung eingefroren wurden, sondern einfach nur in Rinderleber-Peptonwasser. Die 2 Tage lang bebrüteten Kulturen wurden nach Entfernung der Leberstückchen in sterile Ampullen abgefüllt und dann lyophilisiert. So getrocknete Stämme blieben während einer Beobachtungszeit von 6 Monaten am Leben.

LEIDL u. MAHRLA (82) lyophilisierten ebenfalls in Thiol-Medium gezüchtete Vibrio-fetus-Stämme und stellten dabei fest, daß die Vibrionen sowohl bei langsamer als auch bei schneller Abkühlung auf - 79° C und ebenso in Kulturen

mit und ohne Glyzerin-Zusatz vermehrungsfähig blieben.

10. Biochemisches Verhalten von Vibrio fetus.

Katalase-Aktivität:

BRYNER u. FRANK (18) stellten fest, daß pathogene Vibrionen (Vibrio fetus) katalase-aktiv und apathogene Vibrionen, die aus den genitalen Sekreten männlicher und weiblicher Rinder isoliert worden waren, katalase-negativ sind (siehe auch S. 8). Für die Prüfung wurde die von BLOM u. CHRISTENSEN+) angegebene Test-Methode modifiziert. Drei Tage alte Kulturen der verschiedenen Vibrio-Stämme in Bacto-Thiol-Medium (Difco) (genormte Kultur-Röhrchen mit gleichen Mengen Medium) wurden nach Feststellung des Wachstumsbetrages mit der gleichen Menge einer 3%igen H_2O_2-Lösung versetzt, die Röhrchen sofort durch einen von einer Kapillare durchbohrten Gummistopfen verschlossen und umgedreht in ein Gestell gesetzt. Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels in den Röhrchen (Kultur-Medium + H_2O_2-Lösung) wurde mit einem Fettstift am Glas markiert. Nach 5, 10, 15 und 20 Minuten erfolgte die Ablesung der Reaktion, wobei die durch den freigesetzten Sauerstoff verdrängte Flüssigkeitsmenge in Millimetern gemessen und als "Katalasezahl" notiert wurde. Vibrionen-Stämme, deren Katalasezahl kleiner als 5 (mm) war, wurden als katalase-negativ betrachtet. RISTIC u. Mitarbeiter (123) arbeiteten nach einer exakteren Methode, indem sie den Katalase-Test mit Vibrio-Suspensionen machten, die

---

+) E. Blom u. N. O. Christensen :
Studies on Pathological Conditions in the Testis, Epididymis, and Accessory Sex Glands in the Bull;
Scand, Vet. Tidskr., 37 (1947) : 1 - 49 .

durch Abschwemmen 60 Stunden alter Kulturen von Albimi-Brucella-Agar gewonnen und auf eine Lichtdurchlässigkeit von 32 % (Leitz-Photoelektr. -Kolorimeter) eingestellt worden waren (annähernd gleich dem McFarland-Standard Nr. 2). Sie versetzten 10 ml Suspension mit 10 ml 3%iger H_2O_2-Lösung und maßen die durch die eventuell vorhandene Katalase-Aktivität freigesetzte Sauerstoffmenge (gemessen durch Wasserverdrängung) in Millimetern 30 Minuten nach Ansetzen des Versuches, wobei Feststellungen gemacht wurden, die denen von BRYNER u. FRANK glichen. Auch KUZDAS u. MORSE (77) und CHEVÉ u. GAUTHIER (20) ermittelten, daß sich Vibrio fetus als katalase-aktiv und apathogene Vibrionen (Vibrio bubulus) als katalase-negativ erwiesen.

H_2S - Bildung

FLORENT (35) beobachtete, daß H_2S von apathogenen Vibrionen (Vibrio bubulus), nicht aber von Vibrio fetus gebildet wurde. BRYNER u. FRANK (18) verwendeten zur Prüfung auf H_2S-Bildung ein Medium, das aus 1000, 0 ml Rindfleischwasser + 10, 0 g Pepton + 5, 0 g NaCl (pH 7, 2) bestand und das zu je 8 ml in Kultur-Röhrchen abgefüllt war. Jedes Röhrchen beimpften sie mit 0, 5 ml konzentrierter Thiol-Kultur und klemmten in den Stopfen einen Bleiazetat-Papierstreifen. Nach 24stündiger aerober Bebrütung bei 37°C wurde die Reaktion abgelesen, wobei eine Schwärzung des Streifens als positiv bewertet wurde; waren nur Spuren einer Schwärzung erkennbar, so wurde die Reaktion als negativ angesehen. KUZDAS u. MORSE (77) bebrüteten die Test-Kulturen 3 Tage lang unter aeroben Bedingungen bei 37°C in Röhrchen, die 15 ml Albimi-Brucella-Bouillon + 0, 1 % Agar (pH 7, 0) enthielten und in deren Schraubkapsel Bleiazetatpapier befestigt war. PRICE u. Mitarbeiter (113) verwendeten zum Nachweis der H_2S-Bildung durch Vibrionen Kligler-Agar (Baltmore Bacteriological Laboratories), auf dem bzw. in dem sie Strich- und Stichkulturen anlegten, die sie 5 Tage lang bei 37° C

bebrüteten. GRÖGEL (50) bediente sich zum Nachweis der H_2S-Bildung ebenfalls des Eisen-sulfat-Agars nach Kligler.

Von allen diesen Autoren wurde übereinstimmend festgestellt, daß H_2S nur von den aus Präputial-Material und Sperma von Bullen oder den aus dem Vaginal-Schleim von weiblichen Rindern isolierten und als apathogen angesehenen Vibrionen-Stämmen (Vibrio bubulus) produziert wird, die sich gleichzeitig als katalase-negativ erweisen. Bei Vibrio-fetus-Stämmen (katalase-aktiv) konnte von den eben genannten Autoren keine H_2S-Bildung nachgewiesen werden.
Abweichend hiervon berichteten MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92), daß sie bei zwei aus abortierten Rinder-Feten isolierten Vibrio-fetus-Stämmen, die sich als stark katalase-aktiv erwiesen, gleichzeitig auch eine reichliche H_2S-Bildung beobachten konnten. Auch TERPSTRA (156) isolierte Vibrionen-Stämme, die sowohl katalase-aktiv als auch H_2S-positiv waren.

Nitrat-Reduktion:

Verschiedene Autoren berichteten übereinstimmend, daß sowohl die katalase-aktiven (Vibrio fetus) als auch die katalase-negativen (Vibrio bubulus) Vibrionen-Stämme Nitrat zu Nitrit zu reduzieren vermögen.

BRYNER u. FRANK (18) bebrüteten die zu prüfenden Stämme in einem Medium, das sich zusammensetzte aus 10,0 g Pepton, 5,0 g NaCl, 3,0 g Rindfleischextrakt und 1,0 g $NaNO_3$ in 1000,0 ml Aqua dest. und dessen Reaktion vor dem Sterilisieren auf pH 7,2 eingestellt wurde. Die Nitrat-Reduktion wurde mit Sulfanilsäure und α-Nyphthylamin (Standard-Reagenzien) nachgewiesen; in positiven Fällen war die Reduktion von Nitrat an einer roten bis kastanienbraunen Verfärbung erkennbar. PRICE u. Mitarbeiter (113) verwendeten für den Nitrat-Reduktions-

Test Trypticase-Nitrat-Bouillon (Baltimore Bacteriological Laboratories) und KUZDAS u. MORSE (77) Albimi-Brucella-Bouillon mit einem Zusatz von 0,1 % Agar und 0,1 % $NaNO_3$. Beide Forschergruppen bebrüteten die Medien 3 - 5 Tage lang bei 37°C unter aeroben Bedingungen und wiesen anschließend die Nitrat-Reduktion durch Zusatz von Sulfanilsäure und α-Naphthylamin nach.

Nach CHEVÉ u. GAUTHIER (20) ist das Vermögen, Nitrat zu reduzieren, als charakteristisch für alle Vibrionen-Stämme (Vibrio fetus und Vibrio bubulus) anzusehen.

NH_3-Bildung:

STEGER (146) wies bei allen untersuchten Vibrio-fetus-Stämmen die Bildung von NH_3 nach. Er versetzte 0,2 ml einer gut bewachsenen Vibrio-fetus-Pepton-Bouillon-Kultur mit 3,0 ml Aqua bidest. sowie mit 1,0 ml einer 4%igen Phenol-Lösung und 1,0 ml Kaliumhypochlorid-Lösung, worauf innerhalb von 20 Minuten der positive Ausgang der Reaktion und somit der NH_3-Nachweis an einer intensiven blaugrünen Verfärbung der Flüssigkeit erkennbar wurde. Unbeimpfte Kontrollröhrchen zeigten nur ganz schwache hellbläuliche Verfärbungen. Die Bildung von NH_3 durch Vibrio fetus fand im übrigen schon ihren Ausdruck in der Verschiebung des pH-Wertes in bewachsenen Nährmedien (Bacto-Thiol-Medium (Difco)) nach der alkalischen Seite um durchschnittlich 1,1 Grade. CHEVÉ u. GAUTHIER (20) wiesen die Bildung von NH_3 bei 3 von 7 untersuchten Vibrionen-Stämmen nach.

Reduktion von Lackmus-Milch:

PRICE u. Mitarbeiter (113) beobachteten, daß die meisten Vibrionen-Stämme (pathogene und apathogene) in abgerahmter Handelsmilch mit einem Zusatz von 5,0 ml einer 1%igen wäßrigen Azolithmin-Lösung pro Liter (Sterilisation 15 Minuten bei 121°C), wenn sie über-

haupt darin wuchsen, den Farbstoff geringgradig reduzierten. KUZDAS u. MORSE (77) stellten fest, daß die Vibrionen in frischer, nicht pasteurisierter Milch, der soviel Lackmus-Lösung (20,0 g Lackmus in 100,0 ml Aqua dest., filtriert) zugesetzt worden war, bis die Milch eine mittlere Lavendelfarbe angenommen hatte, nur sehr schlecht gediehen. Sie fügten deshalb der Milch 0,1 % Agar zu, da sie ermittelt hatten, daß die Vibrionen am besten in Medien gediehen, die eine solche Agar-Konzentration besaßen. Die Lackmus-Milch mit dem Agarzusatz wurde in Schraubkapsel-Röhrchen zu je 15 ml abgefüllt und nach der Beimpfung bei 37°C bebrütet. In diesem Medium wuchsen alle Vibrionen-Stämme gut (pathogene und apathogene) und produzierten nach 48stündiger Bebrütung eine deutliche Alkali-Zone von 1 - 6 mm Dicke unmittelbar unter dem Flüssigkeitsspiegel. Dieser Reaktion folgte eine vollständige Reduktion des restlichen, vorher unverändert gebliebenen Farbstoffes nach 96stündiger Bebrütung, wobei die oberflächliche Alkalizone bestehen blieb. Eine Gerinnung der Milch trat nicht ein.

Kohlenhydrate, Glykoside und höhere Alkohole werden weder von Vibrio fetus noch von apathogenen Vibrionen (Vibrio bubulus) angegriffen (113, 123, 146, 20, 52). Untersucht wurde das Verhalten der Vibrionen gegenüber Dextrose, Laktose, Galaktose, Glukose, Saccharose, Maltose, Arabinose, Rhamnose, Xylose, Adonit, Dulcit, Inosit, Mannit, Sorbit, d-Tartrat, Äskulin, Salizin, Glyzerin.

Harnstoff und Allantoin werden nicht (77) oder nur ausnahmsweise verändert (20).

Indol wird nicht gebildet (77, 113, 146, 20, 52).

Gelatine wird nicht verflüssigt (77, 113, 146, 20, 52). Übereinstimmend wurde berichtet, daß Vibrio fetus wie

auch die apathogenen Vibrionen (Vibrio bubulus) in Nährgelatine nur schlecht wuchsen. KUZDAS u. MORSE (77) beobachteten jedoch, daß die Vibrionen in Nährgelatine gut gediehen, wenn diese 0,1 % Agar enthielt.

Die Voges-Proskauer Reaktion verläuft bei Vibrio fetus (in dextrose-haltigem Nährmedium gezüchtet) negativ (STEGER (146)).

Hämolyse erfolgt weder durch Vibrio fetus noch durch Vibrio bubulus (20).

NaCl-Toleranz:

KUZDAS u. MORSE (77) verwendeten für die Ermittlung der NaCl-Toleranz der verschiedenen Vibrionen Albimi-Brucella-Bouillon mit 0,1 % Agar-Gehalt, der NaCl in verschiedenen Mengen zugefügt worden war und bebrüteten die beimpften Medien aerob bei 37°C in Schraubkapsel-Röhrchen für eine Zeit von 2 Wochen, während der die Kulturen regelmäßig auf Wachstum untersucht wurden. Hierbei ergab sich, daß die aus Bullen-Sperma und -Präputial-Material sowie aus Vaginalschleim weiblicher Rinder isolierten katalase-negativen Vibrionen (apathogen) ohne Schwierigkeit in Medien kultiviert werden konnten, deren NaCl-Konzentration 3,5 % und mehr betrug. Vibrio-fetus-Stämme boviner, oviner und humaner Herkunft zeigten dagegen nur ein Wachstum, wenn die NaCl-Konzentration in dem Nährmedium 2,5 % nicht überstieg.

Dextrose-Toleranz:

Für die Prüfung der Dextrose-Toleranz der verschiedenen Vibrionen benutzten KUZDAS u. MORSE (77) ebenfalls Albimi-Brucella-Bouillon mit 0,1 % Agar-Gehalt, der Dextrose in verschiedenen Mengen zugesetzt worden war. Die beimpften Medien wurden aerob bei 37°C zwei Wochen lang in Schraubkapsel-Röhrchen bebrütet

und während dieser Zeit regelmäßig auf Wachstum geprüft. Es wurde ermittelt, daß sowohl Vibrio fetus als auch die apathogenen Vibrionen (Vibrio bubulus) eine Dextrose-Konzentration von 8 - 11,5 % in dem Nährmedium vertragen.

11. Differenzierung der in den Genitalorganen von Rindern sowie in bovinem Abortus-Material vorkommenden Vibrionen.

Hier sollen nur die Möglichkeiten der bakteriologischen Differenzierung von Vibrio fetus und apathogenen Vibrionen angeführt werden, ungeachtet dessen, daß der serologischen Differenzierung ebenfalls große Bedeutung zukommt.

Vibrio fetus unterscheidet sich von den anderen im Genitale von Rindern und im Abortus-Material vorkommenden Vibrionen durch die nachfolgend genannten Merkmale (siehe auch S. 7 - 11).

In Nativ-Präparaten von Untersuchungsmaterial (besonders Abortus-Material sind die Zellen von Vibrio fetus im Gegensatz zu denen der apathogenen Vibrionen (V. bubulus) meist kaum noch beweglich oder unbeweglich (FLORENT (37), VANDEPLASSCHE (163), HUBRIG (58)).

In Kulturen bildet Vibrio fetus kurze und lange Zell-Formen bzw. - Verbände (bis zu 10 μ Länge und mehr) und neigt dazu, seine Beweglichkeit zu vermindern oder mitunter auch ganz zu verlieren, wohingegen die Zellen der apathogenen Vibrionen auch bei fortlaufender Subkultivierung stets komma- oder S-förmig bleiben und ihre große Beweglichkeit beibehalten (FLORENT (35, 159), VANDEPLASSCHE u. Mitarbeiter (163, 165), AKKERMANS u. Mitarbeiter (5) u. a.).

KUZDAS u. MORSE (77) berichten, daß sie die verschiedenen Vibrionen-Arten oder -Typen auf Grund ihrer Fä-

higkeit, noch bei Temperaturen von 5, 15 oder 20°C zu wachsen, differenzieren konnten. Tierpathogene Vibrionen der katalase-positiven und H_2S-negativen Gruppe (V. fetus) ließen noch bei 15°C ein sichtbares Wachstum erkennen, wohingegen die Vibrionen der katalase-negativen und H_2S-positiven Gruppe (apathogen), die aus dem Sperma oder Präputial-Material von Bullen oder Vaginal-Schleim von Kühen isoliert worden waren (V. bubulus), ein solches zwar noch bei 20°C aber nicht mehr bei 15°C zeigten. Vibrio metschnikovi, V. percolans, V. rubicundus und V. cuneatus konnten noch bei 5°C gezüchtet werden.

Nach FLORENT u. THOUVENOT (35, 159), VANDEPLASSCHE u. Mitarbeitern (163, 165) und AKKERMANS u. Mitarbeitern (5) ist für das Wachstum von apathogenen Vibrionen (V. bubulus) eine stärkere Herabsetzung der Sauerstoffspannung in der Bebrütungsatmosphäre notwendig als für das von Vibrio fetus.

Bovine und ovine Vibrio-fetus-Stämme konnten von REICH, MORSE u. WILSON (119) entsprechend ihrer Herkunft auf Grund der Tatsache differenziert werden, daß die ovinen Stämme noch in einer Atmosphäre von 24 mm Hg Luft und 676 mm Stickstoff gediehen, in der die bovinen Stämme kein sichtbares Wachstum mehr erkennen ließen.

Im Gegensatz zu Vibrio fetus wachsen die apathogenen Vibrionen (V. bubulus) in Stichkulturen auch in der Tiefe des Nährmediums (FLORENT u. THOUVENOT (35, 159), BRYNER u. FRANK (18), AKKERMANS u. Mitarbeiter (5), VANDEPLASSCHE u. Mitarbeiter (163, 165), LINDQUIST (87) u. a.).

In Bacto-Thiol-Medium (Difco) wird das Wachstum von Vibrio fetus und von apathogenen Vibrionen von GÖTZ (48) wie folgt beschrieben:

Die pathogenen Vibrionen (V. fetus) wachsen in Form einer schleier- oder haarknäuelartig getrübten Schicht nur im oberen Teil des Nährmediums dicht unter der Oberfläche, während die tieferen Schichten des Mediums nicht getrübt werden;
die apathogenen Vibrionen dagegen wachsen in Form leichter, hauch- oder schleierartiger Trübungen sowohl dicht unter der Oberfläche als auch in den tieferen Schichten des Nährmediums bis fast zum Grunde der Kulturröhrchen.

Nach THOUVENOT u. FLORENT (159) ist das Wachstum apathogener Vibrionen (V. bubulus) in halbflüssigen Nährmedien an einer weißlichen, sehr dünnen Scheibe erkennbar, die etwa 5 mm unterhalb der Oberfläche des Nährsubstrates auftritt.

Die Differenzierung pathogener und apathogener Vibrionen ist bereits bei der Erst-Isolierung dieser Keime möglich, wenn das Untersuchungsmaterial auf Pferdeblutagar-Platten kultiviert wurde und nach der Bebrütung auf den Platten Einzelkolonien zur Beurteilung vorliegen.

BRYNER u. FRANK (19) konnten Vibrio fetus und apathogene Vibrionen im allgemeinen durch die Farbe des Wachstums auf Blutagar unterscheiden:

Vibrio fetus brachte weißliche Kolonien oder ein flächenhaftes Wachstum mit bläulicher Färbung hervor;
die apathogenen Vibrionen waren dagegen an einem bräunlichgrünen, mehr flächenhaften Wachstum mit einem metallischen Schimmer und gelegentlicher partieller, schwacher Hämolyse erkennbar.

In einigen Fällen gelang die Differenzierung der beiden Vibrio-Arten jedoch nur durch die biochemische Prüfung.

Untersuchungen von HUBRIG u. RÖHR (59) ergaben, daß Vibrio fetus (katalase-positiv und H_2S-negativ) auf Blutagar

eine charakteristische Kolonie-Form bildet. Vibrio fetus zeigt auf 20%igem Pferdeblutagar (2,5 % Agar-Gehalt, 20 % defibriniertes Pferdeblut; pH vor dem Sterilisieren 7,8) nach 3tägiger Bebrütung bei 37°C in einer 20 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre kleine, rotlaufartige, im Durchmesser 1 - 2 mm große, leicht konvexe, teilweise unscharf begrenzte Kolonien mit glatter, glänzender Oberfläche. Bei stereo-mikroskopischer Betrachtung weisen diese Kolonien eine eigenartige feinkörnige Granulierung auf, durch die sie ein bläulich-weißes oder metallisch-glänzendes Aussehen erhalten. Apathogene Vibrionen (katalase-negativ und H_2S-positiv) zeigen zwar ein gleichartiges Wachstum, dem jedoch eine gelbgrünliche oder gelbweißliche bis ockerfarbige Tönung zu eigen ist. HUBRIG u. RÖHR berichten, daß bei insgesamt 358 Feststellungen von Vibrionen (174 pathogene und 184 apathogene Vibrionen-Stämme isoliert) nur in 2 Fällen Zweifel auftraten, ob es sich bei den isolierten Vibrionen nach dem Aussehen der Kolonien um Vibrio fetus oder um apathogene Vibrionen habe handeln können.

Bei dem kulturellen Nachweis von Vibrionen auf Blutagar ist es somit möglich, Vibrio fetus von apathogenen Vibrionen mit relativ großer Sicherheit bereits in den Primärkulturen auf Grund des verschiedenartigen Charakters ihres Koloniewachstums zu unterscheiden. HUBRIG u. RÖHR weisen aber darauf hin, daß diese Unterscheidung erschwert sein kann, wenn es sich um laufend im Laboratorium überimpfte Kulturen handelt oder die Blutagar-Platten einen so hohen Feuchtigkeitsgehalt haben, daß eine Rasenbildung auftritt (im übrigen siehe S. 99).

Die größte Sicherheit für die Differenzierung von Vibrio fetus und apathogenen Vibrionen bietet noch immer die biochemische Prüfung der isolierten Stämme auf der Grundlage der von BRYNER u. FRANK (18) angegebenen Test-Methoden, die heute praktisch in allen Laboratorien angewendet werden.

Von Bedeutung sind hierbei die Prüfung der Katalase-Aktivität und die Prüfung der H_2S-Bildung (Ausführung siehe S. 107/108). Vibrio fetus erweist sich als katalase-positiv und H_2S-negativ im Gegensatz zu den apathogenen Vibrionen (V. bubulus), die katalase-negativ und H_2S-positiv sind (BRYNER u. FRANK (18), HUBRIG u. Mitarbeiter (59, 60), AKKERMANS u. Mitarbeiter (5), CHEVÉ u. Mitarbeiter (20), KUZDAS u. MORSE (77), VANDEPLASSCHE u. Mitarbeiter (163, 165) u.a.).

Nach Mitteilung von TERPSTRA (156) gibt es jedoch pathogene Vibrionen-Stämme, die neben starker Katalase-Aktivität auch das Vermögen besitzen, reichlich H_2S zu bilden. TERPSTRA isolierte solche Stämme aus abortierten Rinder-Feten. Die experimentelle Übertragung dieser Stämme auf Versuchstiere führte zu Aborten und zur Ausbildung von Agglutininen im Vaginal-Schleim der betreffenden Tiere (apathogene Vibrionen rufen nie die Bildung von Agglutininen im Vaginal-Schleim hervor). MITSCHERLICH u. FORSCHNER (92) erhoben gleichartige Befunde an zwei aus abortierten Rinder-Feten isolierten Vibrionen-Stämmen und sind der Ansicht, daß die Bildung von H_2S durch einen Vibrionen-Stamm mithin nicht gegen seine Identifizierung als Vibrio fetus spricht. Ebenso äußern CHEVÉ u. GAUTHIER (20) Zweifel an dem Wert des alleinigen H_2S-Nachweises für die Differenzierung pathogener und apathogener Vibrionen (V. fetus und V. bubulus).

Über eine weitere Möglichkeit, Vibrio fetus und apathogene Vibrionen voneinander zu differenzieren, berichten KUZDAS u. MORSE (77). Sie stellten fest, daß die aus Sperma- und Präputial-Material von Bullen sowie aus Vaginal-Schleim von Kühen isolierten Vibrionen-Stämme (katalase-negativ und H_2S-positiv) ohne Schwierigkeiten in halbflüssigen Nährmedien (0,1 % Agar-Gehalt) kultiviert werden konnten, die 3,5 % NaCl enthielten; Vibrio-

fetus-Stämme boviner, oviner und humaner Herkunft zeigten dagegen nur dann ein Wachstum, wenn die NaCl-Konzentration in den Nährmedien 2,5 % nicht überstieg.

Weitere Angaben über die bakteriologische Differenzierung von Vibrio fetus und aus dem Genitale männlicher und weiblicher Rinder isolierten apathogenen Vibrionen gegenüber Vibrio jejuni, V. suis, V. comma, V. metschnikovi, V. cuneatus, V. percolans, V. rubicundus und V. tyrogenus finden sich unter anderem bei KUZDAS u. MORSE (77) und teilweise bei MUNDT (102) und ROLLE u. MUNDT (131, 132).

12. Widerstandsfähigkeit von Vibrio fetus außerhalb des lebenden Organismus.

Die Therapie-Resistenz von Vibrio fetus wird in der Literatur sehr unterschiedlich beurteilt; übereinstimmend wird jedoch die hohe Empfindlichkeit der Keime gegenüber äußeren Einflüssen hervorgehoben.

SMITH (138) stellte fest, daß Vibrio fetus am empfindlichsten gegen Austrocknung und Hitze ist; die Vibrionen wurden bei einer Temperatur von 55°C innerhalb von 10 Minuten abgetötet, doch widerstehen sie ihr nach BERGEY (13) 5 Minuten lang. STEGER (146) berichtet, daß sich die 8 Minuten lange Erwärmung von Vibrio-fetus-Kulturen (in Bacto-Thiol-Medium (Difco)) im Wasserbad auf 60°C als abtötend erwies.

STEGER (146) ermittelte ferner, daß Sonnenbestrahlung die Lebensfähigkeit von Vibrio-fetus-Kulturen in Bacto-Thiol-Medium innerhalb von 4 Stunden so erheblich schädigte, daß im Gegensatz zu den unvermindert lebensfähigen Kontroll-Kulturen kein weiteres Wachstum mehr beobachtet werden konnte.

LINDENSTRUTH u. WARD (86) schwemmten 3 Tage alte Blutagar-Kulturen von Vibrio-fetus-Stämmen mit physio-

logischer NaCl-Lösung ab und gaben von der Suspension jedes Stammes je 1 ml in je drei mit Heu, Erde und Dünger gefüllte Flaschen, die anschließend bei 37, 20 und 6° C aufbewahrt wurden. Nach 10 Tagen waren die Vibrionen noch in allen Flaschen lebensfähig, nach 20 Tagen nur noch in den bei 6°C gehaltenen Flaschen und nach 30 Tagen auch darin nicht mehr.

ZINTZ (184) beobachtete, daß Vibrio fetus in Rinder- und Schweinejauche seine Lebensvorgänge sofort einstellte.

Nach DEAS (22), WARD u. LEE (172) und anderen Autoren ist Vibrio fetus gegenüber dem Transport sehr empfindlich.

HIGNETT (54) stellte fest, daß der Nachweis der sehr empfindlichen Vibrionen in abortierten Feten nur dann gelingt, wenn diese ganz frisch sind. VOIGT (168, 169) weist ebenfalls darauf hin, daß abortierte Feten möglichst schnell zu untersuchen sind, da Vibrio fetus mit Sicherheit nur in frischem Abortus-Material nachgewiesen werden kann. Nicht nur die kulturelle, sondern auch die mikroskopische Untersuchung von Abortus-Material muß nach STEPKOWSKI (147) möglichst bald erfolgen, da bereits 48 Stunden nach dem Abort im Untersuchungsmaterial (fetaler Mageninhalt), das vorher noch zahlreiche Vibrionen enthielt, diese Keime nicht mehr feststellbar sein können. Auch VANDEPLASSCHE (163) äußert sich in gleichem Sinne, berichtet jedoch, daß Vibrio fetus im uneröffneten Uterus geschlachteter Rinder noch 3 Tage lang lebensfähig bleibt.

Die Untersuchungen von GÖTZ (48) ergaben, daß die Anzüchtung des von männlichen und weiblichen Rindern entnommenen Untersuchungsmaterials baldmöglichst nach der Entnahme notwendig ist, da die Sicherheit des kulturellen Nachweises der Vibrionen schon in einem Zeitraum von 24 Stunden zwischen Entnahme und Anzüchtung

der Proben um mehr als 50 % absinken kann.

Aus dem Genitaltrakt weiblicher Rinder entnommene Schleim-Proben müssen nach HUGHES (65), TERPSTRA (154) und anderen Autoren so bald als möglich angezüchtet werden, andernfalls der Nachweis der Vibrionen sehr unsicher wird. VOIGT (170) stellte fest, daß Vibrio fetus eine Antrocknung in den Tupfer-Proben nicht übersteht. Auch HUBRIG u. Mitarbeiter (62) weisen auf die Notwendigkeit hin, mit Tupfern entnommene Schleim-Proben rasch anzuzüchten, da sich Vibrio fetus sonst nach 24 Stunden nicht mehr kulturell ermitteln läßt.

Die meisten Autoren vertreten die Ansicht, daß auch die von Bullen entnommenen Sperma- und Präputial-Proben baldmöglichst angezüchtet werden, soll der Nachweis von Vibrio fetus mit ausreichender Sicherheit gelingen. HUBRIG und Mitarbeiter (62) konnten jedoch experimentell nachweisen, daß Vibrio fetus auch eine 24stündige Aufbewahrung in der Präputial-Spülflüssigkeit verträgt, wobei Aufbewahrungs-Temperaturen zwischen + 2, 5°C und + 30°C ohne wesentlichen Einfluß auf die Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit der Vibrionen zu sein schien. Ein etwas besseres Wachstum der Vibrionen konnte allerdings erzielt werden, wenn die Aufbewahrungs-Temperatur zwischen + 2, 5°C und + 7, 5°C gelegen hat. Nach STEGER (146) setzt die Kühlraum-Temperatur (+ 4°C) die Lebensfähigkeit von Vibrio fetus innerhalb von 26 Stunden so weit herab, daß die Keime kaum noch oder nicht mehr weitergezüchtet werden können, eine Auffassung, die von WEIKL nicht bestätigt werden konnte, da ihm die Weiterzüchtung der im Kühlschrank aufbewahrten Kulturen (in Bacto-Thiol-Medium und in Leber-Peptonwasser) noch nach 5 Wochen gelang. HUBRIG (54) gelang es, Vibrionen in einigen Fällen aus Sperma-Proben zu züchten, die Penicillin- oder Sulfonamid-Zusätze enthielten und außerdem bei Kühlschrank-Temperaturen aufbewahrt worden waren. FLATLA u. Mitarbeiter (34)

kultivierten Vibrio fetus sogar noch aus dem Sperma infizierter Bullen, nachdem dieses 6 Tage lang bei + 4° C gelagert worden war. ROBINSON u. Mitarbeiter (130) isolierten Vibrio fetus aus dem Mageninhalt abortierter Meerschweinchen-Feten, deren Mütter einige Tage vorher das Sperma infizierter Bullen intraperitoneal injiziert erhalten hatten, das in Eis verpackt (Süd-Afrika) ca. 1500 Kilometer per Bahn verschickt worden war.

ZINTZ (184) beobachtete, daß die Zellen von Vibrio fetus in einer Kultur, der E. coli zugesetzt worden war, bereits nach 24stündiger Bebrütung zerfallen waren. Wurden Vibrio fetus enthaltende Kulturen mit Pseudomonas aeroginosa beimpft, so war 24 Stunden später keine Vibrio-fetus-Zelle mehr festzustellen. Auch ROLLE u. MUNDT (131) ermittelten, daß E. coli und weiterhin Bac. mesentericus das Wachstum von Vibrio fetus unterdrückten; Vibrio fetus und Mikrokokken hemmen ihr Wachstum gegenseitig.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methoden

1. Untersuchungsmaterial.

a) Von Aborten bei Rindern stammendes Material:

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, in dem die relative Häufigkeit des Vorkommens von Vibrionen in abortierten Rinderfeten und ihren verschiedenen Organen sowie in den zugehörigen Secundinae ermittelt werden sollte, wurden insgesamt 57 abortierte Feten verschiedenen Entwicklungsalters, darunter 4 Zwillinge, bakteriologisch untersucht (= 55 Abortus-Fälle).

Diese Untersuchungen erstreckten sich auf alle Feten, die in der Zeit vom 4.6.1957 bis zum 16.8.1957 aus Ober- und Niederbayern sowie aus Schwaben zur Feststellung von Abortus-Erregern an die Bayerische Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung eingesandt worden waren. In 38 Fällen standen Fetus und zugehörige Secundinae sowie 11mal das Fruchtwasser, in den übrigen 17 Fällen nur der Fetus zur Verfügung.

Das Entwicklungsalter der in sehr unterschiedlichem Zustand eingelieferten Feten lag zwischen etwa 4 Wochen und 8 1/2 Monaten (siehe Tab. I auf S. 150 und Tab. II a, b, III im Anhang). Während die meisten Feten mehr oder weniger frisch und gut erhalten waren, wiesen die übrigen verschiedene Grade einer Mumifikation oder Zersetzung auf (siehe Anhang Tab. II a, b, III). Wegen sehr starker oder totaler Mumifikation oder Zerreißung und Benagung sowie wegen noch unvollständiger Ausbildung konnten nicht in jedem Fall alle Organe der betroffenen Feten untersucht werden.

Ferner wurden verschiedene Nachgeburtsproben und fetale Mageninhalte, die ebenfalls von Aborten stammten und in denen bei der Routine-Untersuchung in der Lan-

desanstalt Vibrionen mikroskopisch nachgewiesen worden waren, dem Kulturversuch unterzogen, der in diesen Fällen vornehmlich dazu diente, die Eignung verschiedener Nährmedien für die Isolierung der Vibrionen - insbesondere Vibrio fetus - zu prüfen.

b) Von geschlachteten Kühen stammendes Material:

Im zweiten Teil dieser Arbeit, in dem das Vorkommen von Vibrionen in den verschiedenen Organen nicht-abortierter Rinder-Feten sowie in den zugehörigen Secundinae und Fruchtwässern ermittelt werden sollte, wurden 50 Feten einschließlich ihrer Secundinae und Früchtwässer bakteriologisch untersucht. Diese Feten waren am Schlachthof in München in der Zeit vom 20.8.1957 bis zum 1.10.57 bei der Schlachtung trächtiger Kühe angefallen.

Das Entwicklungsalter der in diesem Teil der Arbeit untersuchten Feten lag zwischen 2 und 9 Monaten, doch stammte die meisten Feten aus der zweiten Hälfte der Trächtigkeit (siehe Tab. IV auf S. 160). Es wurde nur solches Material untersucht, bei dem weder der Fetus noch die Secundinae oder das Fruchtwasser irgendwelche Anzeichen erkennen ließen, die auf das Vorliegen eines pathologischen Prozesses hätten deuten können.

c) Von Bullen stammendes Material:

Im letzten Teil der Arbeit wurden insgesamt 58 Bullen, die in drei bayerischen Besamungs-Stationen (A, B. und C) aufgestellt waren, bakteriologisch auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht. Die Untersuchungen erstreckten sich hierbei auf Präputial-Spülproben und bei 49 Bullen gleichzeitig auch auf Sperma-Proben (Station "A" und "B"); die Proben waren in der Zeit von Mitte Dezember 1957 bis Anfang Februar 1958 entnommen

worden.

Einesteils sollte festgestellt werden, wieviel der Bullen mit Vibrionen (pathogen und apathogen) behaftet waren und andernteils insbesondere geprüft werden, ob die kulturelle Untersuchung der Präputial-Spülprobe oder die des Spermas zu einem verläßlicheren Resultat hinsichtlich des Nachweises der Vibrionen führt. Weiterhin galt es, verschiedene Nährmedien auf ihre Eignung für die Isolierung der Vibrionen aus den zumeist mit banalen Keimen verunreinigten Proben zu prüfen.

2. Gewinnung und Anzüchtung des Untersuchungsmaterials.

a) Von Aborten bei Rindern stammendes Material:

Die Zeit, die vom Abort bis zur mikroskopischen Untersuchung und zur Anzüchtung der an die Landesanstalt eingesandten Feten und Secundinae verstrich, hing im wesentlichen von der Dauer des Transportes zur Anstalt ab (Auto, Bahn, Post) und schwankte zwischen 6 Stunden und 4 Tagen. Leider konnte dieser Zeitraum nicht genau bestimmt werden, da der Zeitpunkt des Abortes in den Begleitschreiben zu den Einsendungen nur selten mitgeteilt wurde, weswegen allgemein auf eine solche Bestimmung verzichtet wurde.

Für die mikroskopische Untersuchung wurden vom Mageninhalt der Feten und von den Secundinae (Kotyledonen) Nativ-Präparate (a) und mit 1 : 4 verdünnter Karbolfuchsin-Lösung gefärbte Ausstrich-Präparate (b) angefertigt, deren Durchsicht phasenkontrastmikroskopisch (a) bei einer Vergrößerung von 1 : 400 und im Hellfeld mit Ölimmersion (b) bei einer Vergrößerung von 1 : 600 erfolgte.

Für die kulturelle Untersuchung wurde Material unter streng sterilen Kautelen aus folgenden Organen der Fe-

ten - soweit möglich - entnommen : Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz, Magen, Darm, Gehirn, und ferner - soweit eingesandt - von den Secundinae (Kotyledonen) und dem Fruchtwasser (siehe S. 122).

Die Proben wurden aus den Organen mittels einer Platin-Öse gewonnen und mit dieser durch Stich in halbfestes Bacto-Thiol-Medium (Difco) mit 0,5 % Agar-Gehalt verimpft, wobei die Öse entlang der Wand des Kultur-Röhrchens im Nährsubstrat mehrmals auf und ab bewegt wurde. Von den Kotyledonen der Secundinae gelang es nicht immer mit der Öse Impfmaterial abzustreifen; in solchen Fällen wurde etwas Material von den Kotyledonen mit einem Skalpell abgekratzt und das so erhaltene Geschabsel dann mit der Öse in das Nährmedium übertragen. Waren die Fruchtblasen noch erhalten und geschlossen, wie es meist bei von Frühaborten stammenden Einsendungen der Fall war, so wurden sie unter sterilen Kautelen eröffnet. Mit einer dünnen Pipette wurde sodann etwas Fruchtwasser aufgezogen und in das Nährsubstrat verbracht. In jedem Fall erfolgte die Beimpfung des Nährmediums mit möglichst viel Material.

Für den kulturellen Nachweis von Vibrionen im Untersuchungsgut wurde zunächst ausschließlich Bacto-Thiol-Medium (Difco) in halbfester Form mit 0,5 % Agar-Gehalt verwendet, wobei mit dem von den einzelnen fetalen Organen und von den Secundinae gewonnenen Material jeweils zwei mit Wattestopfen verschlossene Kultur-Röhrchen beimpft wurden, deren Bebrütung anschließend 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen stattfand.

Bei späteren kulturellen Untersuchungen, die vorwiegend der Prüfung verschiedener Nährmedien hinsichtlich ihrer Eignung für die Isolierung der Vibrionen dienten, wurde das Abortus-Material in halbfestem Bacto-Thiol-Medium sowie auf festem Bacto-Thiol-Me-

dium, Brillantgrün-Blutagar, Brillantgrün-Kochblutagar, 10%igem Pferdeblutagar, Schokolade-Blutagar nach REYMANN, 20%igem Pferdeblutagar und 20%igem Pferde-Kochblutagar angezüchtet. Diese Nährmedien wurden nach ihrer Beimpfung 3 - 4 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Nachdem die beimpften Platten in Vakuum-Exsikkatoren verbracht worden waren, wurden diese mit Hilfe der Pfeiffer' schen Elektro-Vakuumpumpe evakuiert, wobei eine erfolgreiche Evakuierung daran zu erkennen war, daß das Manometer zur Ruhe kam und die Quecksilbersäule in beiden Schenkeln des U-förmigen Manometers auf annähernd gleicher Höhe stand. Zur Schaffung einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre in den Exsikkatoren wurde CO_2 aus einer Stahlflasche in eine Gummiblase abgefüllt und diese an den seitlichen Stutzen des Exsikkators angeschlossen. Durch mehr oder weniger langes Öffnen des Sperrhahnes am Stutzen konnte das Einströmen von CO_2 in den Exsikkator in gewünschter Menge reguliert werden. Im allgemeinen wurden 10-20 Vol. % CO_2 zugegeben. Obwohl keine Apparatur zur Verfügung stand, mit der der Innendruck der Exsikkatoren hätte gemessen und die CO_2-Zugabe exakt dosiert werden können, führte auch diese Arbeitsweise bei der Züchtung der Vibrionen zu befriedigenden Resultaten.

b) Von geschlachteten Kühen stammendes Material :

Die bei der Schlachtung trächtiger Kühe angefallenen Feten wurden in den uneröffneten Uteri mit Hilfe eines Kraftwagens zur Landesanstalt transportiert. Hier wurden die Uteri zunächst mit kochendem Wasser abgespült und dann vorsichtig aufgeschnitten, ohne dabei die Fruchtblasen zu verletzen. Darauf wurden diese an einer Stelle geöffnet und mit einer sterilen Pipette soviel Fruchtwasser aufgezogen, daß damit zwei Zentrifugier-Röhrchen gefüllt werden konnten. Nach vollständiger Eröff-

nung der Fruchthüllen wurden einige Karunkeln samt den ihnen anhaftenden Kotyledonen von den Secundinae abgetrennt und der Fetus herausgenommen.
Es wurden jeweils kulturell untersucht : Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz, Magen, Darm und Gehirn des Fetus sowie die zugehörigen Secundinae (Kotyledonen) und das Fruchtwasser.

Die Entnahme des Impfmaterials und seine Übertragung in halbfestes Bacto-Thiol-Medium (Difco) mit 0,5 % Agar-Gehalt erfolgte in der gleichen Weise, in der sie bei der Verarbeitung des von Aborten stammenden Untersuchungsgutes vorgenommen worden war. Das in Zentrifugier-Röhrchen abgefüllte Fruchtwasser wurde 40 Minuten bei 4500 U./Min. zentrifugiert; nach dem Abgießen des Überstandes wurde dann ein Teil des Bodensatzes mit der Öse entnommen und in das Nährmedium verimpft. Die Bebrütung der beimpften Kultur-Röhrchen erfolgte 4 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen.

Vom Zeitpunkt der Schlachtung bis zur Anzüchtung des Untersuchungsmaterials vergingen in keinem Fall mehr als 8 Stunden.

c) Von Bullen stammendes Material :

Präputialsekret der Bullen wurde durch die Spülung ihres Präputialsackes gewonnen. Auf besondere Vorsichtsmaßnahmen bei der Proben-Entnahme (Kürzen der Pinselhaare, gründliche Reinigung der Präputialöffnung und ihrer Umgebung etc.) wurde verzichtet, da nach den Angaben von HUBRIG u. Mitarbeitern (62) auch durch ihre Anwendung Verunreinigungen der Spülflüssigkeit durch banale Keime nicht zu verhindern sind (siehe S. 36/37). Es wurde deshalb lediglich versucht, das Entnahme-Instrument möglichst gleich beim ersten Versuch korrekt in die trichterförmige Öffnung des Präputialsackes einzuführen. Als Instrument für die Probe-Entnahme dien-

te ein 100 ml fassender Gummiballon, der ein ca. 20 cm langes Ansatzstück aus Hartgummi trägt, das an seiner Spitze olivenförmig ist und an dem im Gummiballon steckenden Ende einen Schließhahn besitzt. Als Spülflüssigkeit wurde physiologische NaCl-Lösung verwendet. Die Spülung selbst erfolgte nach der üblichen und allgemein bekannten Technik.

Nach der Entnahme wurden die Präputial-Spülproben auf verschiedene Weise für die kulturelle Anzüchtung vorbereitet.
Die von den Bullen der Besamungs-Station "A." entnommenen Spülproben wurden an Ort und Stelle jeweils 3 Minuten bei 3000 U./Min. zentrifugiert, und zwar von jeder Probe zwei Zentrifugier-Röhrchen voll. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde ein Teil des Bodensatzes in halbfestes Bacto-Thiol-Medium (Difco) mit 0,5 % Agar-Gehalt verimpft, wobei mit dem Material jeder Spülprobe jeweils zwei Röhrchen-Kulturen angelegt wurden, deren Bebrütung dann 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen erfolgte.

Die von den Bullen der Besamungs-Stationen "B." und "C." entnommenen Spülproben wurden auf zweierlei Weise verarbeitet.

1.) In Anlehnung an das von HUBRIG u. Mitarbeitern (62) angegebene Verfahren wurden von jeder Spülprobe zwei Zentrifugier-Röhrchen (ca. 15 ml Inhalt) gefüllt und 5 Minuten bei 1000 U./Min. zentrifugiert. Hierbei bildete sich ein dicker aus Schmutz und Bakterien bestehender Bodensatz, der zur kulturellen Untersuchung auf Trichomonas foetus diente. Die überstehende Flüssigkeit wurde in neue Röhrchen umgefüllt und 10 Minuten bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Der Bodensatz wurde verworfen und die überstehende Flüssigkeit abermals in neue Röhrchen umgefüllt und diesmal 40 Minuten bei 4500 U./Min. zentrifugiert. Unmittelbar anschließend

wurde mit einer sterilen Kapillar-Pipette aus jedem Zentrifugier-Röhrchen etwa 1, 5 cm unterhalb des Flüssigkeitsspiegels und etwa 1, 5 cm über dem Boden des Röhrchens ca. 1 - 2 ml Flüssigkeit entnommen und in und auf verschiedene Nährmedien verimpft (=Methode I). HUBRIG u. Mitarbeiter (62) hatten nämlich beobachtet, daß sich die Vibrionen in diesen beiden Zonen der Flüssigkeitssäule konzentrierten, nachdem die Spülproben einmal 10 Minuten bei 3000 U./Min. und nach Umgießen der Überstände diese nochmals 30 Minuten bei 6000 U./Min. zentrifugiert worden waren. Den Autoren gelang es auf diese Weise, relativ saubere Vibrionen-Kulturen zu erhalten. Das Impfmaterial muß unmittelbar nach der Zentrifugation entnommen und verimpft werden, da sich sonst die außerordentlich beweglichen Vibrionen wieder in der Flüssigkeit verteilen. Mit dem nach der eben beschriebenen Methode aus den zwei Zentrifugier-Röhrchen von jeder Spülprobe gewonnenen Material wurden folgende Nährmedien beimpft:

2 Röhrchen mit halbfestem Bacto-Thiol-Medium (0, 5 % Agar)°
1 Brillantgrün-Blutagar-Platte°
1 Frischblutagar-Platte (17 % Blut)
1 Schokolade-Blutagar-Platte (17 % Blut)
1 Frischblutagar-Platte (10 % Blut)°
1 Schokolade-Blutagar-Platte (10 % Blut)°.

Die vorbereiteten Spülproben der Bullen aus Station "B." wurden nur in bzw. auf den mit o gekennzeichneten Nährmedien, die der Bullen aus Station "C." in bzw. auf allen angeführten Nährmedien angezüchtet.

Vergleichsweise wurde das Material für den Kultur-Versuch aus den Spülproben von den Bullen der Besamungs-Stationen "B." und "C." auch auf folgende Weise gewonnen. Mit der Spülflüssigkeit jeder Probe wurden zwei Zentrifugier-Röhrchen gefüllt und diese 10 Minuten bei

1000 U./Min. zentrifugiert, um die Proben zunächst von groben Verunreinigungen zu befreien. Die überstehende Flüssigkeit wurde in neue Röhrchen umgefüllt und nochmals 40 Minuten bei 4500 U./Min. zentrifugiert; der erste Bodensatz fand keine Verwendung. Nach der zweiten Zentrifugation wurde die überstehende Flüssigkeit weggegossen und reichlich Bodensatz aus den beiden Zentrifugier-Röhrchen pro Probe in zwei Kultur-Röhrchen mit halbfestem Bacto-Thiol-Medium (0,5 % Agar-Gehalt) durch Stich verimpft.

In allen Fällen erfolgte die Bebrütung der beimpften Nährmedien 4 Tage bei 37°C, und zwar wurden dabei das halbfeste Medium unter normalen atmosphärischen Bedingungen und die festen Medien in einer mit 15 - 20 % CO_2 angereicherten Atmosphäre (vergleiche S. 126) gehalten.

In keinem Fall vergingen zwischen der Entnahme und der Verarbeitung und Anzüchtung der Präputial-Spülproben mehr als 4 Stunden.

Sperma-Proben wurden nach dem allgemein üblichen Verfahren mit Hilfe der künstlichen Vagina gewonnen. Die Sperma-Proben der Bullen von der Besamungs-Station "A." wurden nach ihrer Entnahme in den üblichen Samen-Transport-Gefäßen in Holzkästen per Bahn an die Landesanstalt geschickt. Infolgedessen vergingen von der Entnahme bis zur Anzüchtung etwa 2 - 3 Tage.

Die Sperma-Proben der Bullen von der Besamungs-Station "B." waren unmittelbar nach ihrer Entnahme an Ort und Stelle von dem Stationstierarzt in das Nährmedium verimpft und dieses anschließend gut verpackt per Bahn an die Anstalt abgesandt worden. Hierbei verstrichen zwischen der Anzüchtung der Sperma-Proben und dem Beginn der Bebrütung etwa 2 Tage.

In allen Fällen wurden pro Sperma-Probe 2 Kultur-Röhrchen, die halbfestes Bacto-Thiol-Medium (Difco) mit 0,5 % Agar-Anteil enthielten, angelegt. Hierbei wurden pro Röhrchen 3 Ösen (5 mm ∅) Sperma durch Stich verimpft, indem die Öse entlang der Wand des Röhrchens im Nährmedium mehrmals auf und ab bewegt wurde.

Die Bebrütung der beimpften Kultur-Röhrchen erfolgte 4 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen.

3. Nährmedien.

Für die Isolierung, Kultivierung und Aufbewahrung von Vibrionen wurden die nachfolgend beschriebenen Nährmedien verwendet.

a) Flüssiges Nährmedium :

Leber-Leberbouillon : Rohe Rinderleber wird von ihrer Kapel und ihren Gallengängen befreit und in Streifen von etwa 3 - 4 cm Länge und 0,5 cm Dicke zerschnitten. Je 2 - 3 dieser Streifen bringt man in das untere Ende von Kultur-Röhrchen und fügt dann etwa 6 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung hinzu (nach ROLLE u. MUNDT (132)) :

Aqua dest.	1000,0 ml
Pepton "Witte" (peptisch verdaut)	10,0 g
NaCl	5,0 g.

Eine Filtration dieser Lösung ist nicht notwendig. Ihr pH-Wert wird bei ca. 50°C auf 8,0 - 8,2 eingestellt. Das Nährsubstrat wird anschließend an 3 aufeinanderfolgenden Tagen in strömendem Dampf (Dampftopf) sterilisiert, wobei seine Reaktion durch den Leber-Anteil eine Verschiebung nach der sauren Seite erfährt und schließlich den gewünschten pH-Endwert 7,0 - 7,2 erreicht. Der Flüssigkeitsspiegel in den Röhrchen sollte nach Möglichkeit 2 - 3 cm oberhalb der Leberstückchen

liegen.

Verwendungszweck: Aufbewahrung isolierter Vibrionen-Stämme; Auffrischung von Laboratoriums-Stämmen, z. B. für biochemische Untersuchungen, Antigen-Herstellung usw.

b) Halbflüssiges und halbfestes Nährmedium:

Bacto-Thiol-Medium (Difco Laboratories Inc., Detroit, Mich.): Dieses Nährsubstrat, das für die Kultivierung von Mikroorganismen aus penicillin- und streptomycin-haltigem Material empfohlen wird (DIFCO MANUAL (26) S. 108 - 109), besitzt folgende Zusammensetzung pro 1000 ml Medium:

Proteose-Pepton Nr. 3	10, 0 g
Bacto-Hefe-Extrakt	5, 0 g
Bacto-Dextrose	1, 0 g
NaCl	5, 0 g
Thiol-Komplex	8, 0 g
Bacto-Agar	1, 0 g
p-Amino-Benzoesäure	0, 05 g.

Um das in dehydrierter Form gelieferte Medium aufzulösen, werden 30, 0 g desselben in 1000 ml kaltem Aqua dest. suspendiert. Die Suspension wird bis zum Kochen erhitzt, damit sich die Substanzen vollständig darin lösen. Je 5 ml der so erhaltenen Lösung werden in mit Wattestopfen verschlossene Kultur-Röhrchen abgefüllt. Die Sterilisation des Mediums erfolgt 15 Minuten bei 121 °C (15 lbs pressure= 1, 1 atü). Danach beträgt der pH-Endwert 7, 2.

Von den amerikanischen Autoren wird die Konsistenz des Mediums als halbfest (semisolid) beschrieben.

Verwendungszweck: Kultivierung und Aufbewahrung sowie kulturelle Differenzierung isolierter Stämme.

Bacto-Thiol-Medium (Difco) mit 0, 5 % Agar-Gehalt: Durch Zugabe von 0, 4 g Agar pro 1000 ml Thiol-Medium wird dessen Agar-Gehalt auf 0, 5 % erhöht, wodurch das Nährsubstrat eine halbfeste, gelee-artige Konsistenz erhält. Diese Modifikation des Thiol-Mediums geht auf einen Hinweis von Mitarbeitern der Rijksseruminrichting in Rotterdam zurück.

Verwendungszweck: Anzüchtung von Untersuchungsmaterial; Anreicherung der Vibrionen in Mischkulturen.

c) Feste Nährmedien:

10%iger Frischblutagar: Zu 1000 ml verflüssigtem und auf ca. 50°C abgekühltem Nähragar (1000 ml Rindfleischwasser + 10, 0 g Pepton "Merck" + 5, 0 g NaCl + 20, 0 g Agar) von pH 7, 4 werden 100 ml steriles defibriniertes Pferdeblut unter ständigem Schwenken zugefügt, wobei eine Blasenbildung möglichst zu vermeiden ist. Sofort danach erfolgt das Gießen der Platten. pH-Endwert 7, 0 - 7, 2.
Verwendungszweck: Isolierung und kulturelle Differenzierung von Vibrionen; Antigen-Herstellung.

"Schokolade"-Blutagar nach VOGES, modifiziert von REYMANN[1]): 100 ml steriles defibriniertes Pferdeblut werden auf ca. 50°C vorgewärmt und mit 900 ml flüssigem, auf 50 - 60°C abgekühltem Nähragar (1000 ml Rindfleischwasser + 10, 0 g Pepton "Merck" + 3, 0 g NaCl + 2, 0 g NaH_2PO_4 + 20, 0 g Agar) von pH 7, 4 versetzt und gründlich gemischt (Blasenbildung). Das Blut-Nähragar-Gemisch wird sodann während einer Zeit von 30 Minuten langsam im Wasserbad auf 75-80°C erwärmt. Anschliessend gießt man das Substrat, ohne es filtriert zu haben,

1) L. Hallmann:
Bakteriologische Nährböden,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1953, S. 93.

unter ständigem leichten Schwenken in Schalen zu Platten aus. Wurde gleichmäßig erwärmt, so erhält man ein homogenes, schokoladebraunes Nährmedium mit einem pH-Endwert von ca. 7,2.

Anfangs wurde dem Nährboden noch 3 % Bacto-Thiol-Medium zugesetzt, da nach Angabe von GÖTZ (48) hierdurch das Wachstum der Vibrionen gefördert und das von Proteus- und Pseudomonas-Arten gehemmt würde, wenn auch nur bei Verwendung frisch hergestellter Platten. Da sich aber bei vergleichenden Prüfungen keine bemerkenswerten Vorteile durch den Zusatz des Thiol-Mediums ergaben, wurde er später weggelassen.

Verwendungszweck: Isolierung von Vibrionen, Antigen-Herstellung.

17%iger Frischblutagar (nach HUBRIG u. Mitarbeitern (62)): Zu 1000 ml verflüssigtem und auf ca. 50°C abgekühltem Nähragar (1000 ml Rindfleischwasser + 10,0 g Pepton "Merck" + 5,0 g NaCl + 25,0 g Agar) von pH 7,8 werden 200 ml steriles defibriniertes Pferdeblut unter ständigem Schwenken zugefügt. Sofort danach erfolgt das Gießen der Platten. pH-Endwert 7,4 - 7,6.
Verwendungszweck: Isolierung und kulturelle Differenzierung von Vibrionen.

17%iger "Schokolade"-Blutagar: Die Herstellung erfolgt in der gleichen Weise wie bei dem Schokolade-Blutagar nach Reymann, gegenüber dem ein Unterschied nur insoweit besteht, als hier ein Nähragar mit 2,5 % Agar-Gehalt von pH 7,8 verwendet wird, dem 17 % Blut (steriles defibriniertes Pferdeblut) zugesetzt werden. pH-Endwert 7,4 - 7,6.

Verwendungszweck: Isolierung von Vibrionen.

d) Selektiv-Medien:

Brillantgrün-Blutagar: Das hier beschriebene Selektiv-Medium wurde durch Kombination der von FLORENT (38) und VAN WAVEREN (173) für die Isolierung von Vibrionen aus Untersuchungsmaterial und verunreinigten Kulturen empfohlenen Medien geschaffen.

FLORENT beschrieb einen Nährboden, der sich aus 1000 ml peptonisierter Rinderherzbouillon + 20,0 g Agar + 3,0 g Bacto-Thiol-Medium + 0,5 g Cystein-HCl zusammensetzt und dessen Reaktion bei pH 6,8 liegt. Kurz vor seiner Verwendung werden dem Nährboden noch 100 ml defibriniertes Hammelblut und 12,5 ml einer Brillantgrün-Lösung 2,2 : 1000 zugefügt (Endkonzentration des Brillantgrüns im Nährmedium = 1 : 40000).

VAN WAVEREN berichtete, daß mit dem Bacto-Brillantgrün-Agar (Difco Laboratories Inc., Detroit, Mich.) bei der Isolierung von Vibrionen an der Rijksseruminrichting in Rotterdam gute Erfahrungen gemacht wurden, da das Ausschwärmen von Proteus vulgaris auf ihm völlig unterblieb. Der Bacto-Brillantgrün-Agar (DIFCO MANUAL (26) S. 167-168) besitzt folgende Zusammensetzung pro 1000 ml Medium:

Bacto-Hefe-Extrakt	3,0 g
Proteose-Pepton Nr. 3, Difco	10,0 g
NaCl	5,0 g
Bacto-Lactose	10,0 g
Saccharose, Difco	10,0 g
Bacto-Agar	20,0 g
Bacto-Phenolrot	0,8 g
Bacto-Brillantgrün	0,0125 g;

pH-Endwert 6,8.

Die beiden vorstehend genannten Nährmedien führten hinsichtlich der Isolierung von Vibrionen aus verunreinigtem Untersuchungsmaterial noch nicht zu völlig befriedigenden Resultaten. Auf dem von FLORENT beschriebenen Nährboden mußten nach Angabe des Autors die Kolonien von Proteus vulgaris spätestens nach 48stündiger Bebrütung ausgestochen werden, um ein vollständiges Überwuchern der Platten zu verhindern; das Wachstum der Vibrionen auf diesen Platten war als gut zu bezeichnen. Bei eigenen Untersuchungen wurde ermittelt, daß auf Bacto-Brillant-Grün-Agar zwar das Schwärmen von Proteus fast gänzlich unterblieb, doch konnten nicht alle Vibrionen-Stämme, die zur Prüfung dieses Mediums verwendet wurden, auf ihm zum Wachsen gebracht werden. Im übrigen nahmen die Brillantgrün-Agar-Platten, wenn sie mit verunreinigtem Untersuchungsmaterial beimpft worden waren, nach der Bebrütung infolge des Wachstums der verschiedensten Keime ein derartig buntes Aussehen an, daß Vibrionen-Kolonien nur nach langem Suchen entdeckt werden konnten.

Aus den dargelegten Gründen wurde versucht, ein neues Selektiv-Medium durch Kombination der beiden besprochenen Nährböden zu schaffen, das deren Vorteile in sich vereinigt, ohne gleichzeitig auch deren Nachteile zu besitzen.

Die Zusammensetzung und Herstellung dieses Selektiv-Mediums ist folgende:

Rinderherz-Fleischwasser	1000 ml
Pepton "Merck" (trypt. verd.)	10,0 g

20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisieren. Das Grundsubstrat kann in großer Menge hergestellt und über längere Zeit im Kühlraum aufbewahrt werden.

Das gebrauchsfertige Medium besteht aus:

Bacto-Brillantgrün-Agar (Difco)	58,0 g

Rinderherz-Pepton-Wasser	1000 ml
Bacto-Thiol-Medium (Difco)	3,0 g
Cystein-HCl	0,5 g.

Die Substanzen werden dem Rinderherz-Pepton-Wasser zugefügt und gründlich darin vermischt. Sodann wird bis zum Kochen erhitzt, wobei öfters umgeschüttelt werden sollte. Nach der Abkühlung des Mediums auf etwa 55°C wird die Reaktion desselben mit n/1 Natronlauge auf pH 7,0 - 7,2 eingestellt. Anschließend erfolgt die Sterilisation des Substrates im strömenden Dampf für 40 Minuten. Aus dem Dampftopf wird das Medium in ein Wasserbad von 57°C gebracht, in dem man gleichzeitig defibriniertes Hammelblut erwärmt. Haben Medium und Blut annähernd die Temperatur von 57°C erreicht, so werden zu 1000 ml Nährmedium 100 ml des defibrinierten Hammelblutes zugegeben. Nach einminütiger Vermischung durch leichtes Schwenken und einem weiteren Aufenthalt von etwa 3 Minuten im Wasserbad wird das Medium in Petrischalen zu Platten, gleich welcher Stärke, gegossen. Das fertige Medium sieht braunrot aus und hat einen pH-Endwert von 6,8 - 6,9; die Endkonzentration des Brillantgrüns beträgt 1 : 80 000.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, den Selektiv-Nährboden vor seiner Verwendung mindestens eine Woche lang im Kühlschrank aufzubewahren, da die Platten danach gut trocken sind und bei ihrer Beimpfung das Impfmaterial förmlich aufsaugen.

Brillantgrün-Kochblutagar : Die Zusammensetzung ist die gleiche wie die des Brillantgrün-(Frisch-)Blutagars. Lediglich die Herstellungsweise ist insofern verschieden, als das defibrinierte Hammelblut zu dem sterilisierten und noch etwa 80°C heißem Medium unter ständigem Umschütteln zugegeben wird.

Der fertige Nährboden (pH-Endwert 6, 8) hat ein homogenes, rötlich-hellbraunes Aussehen.

4. Untersuchung der bebrüteten Kulturen auf Vibrionen-Wachstum.

Um das Wachstum von Vibrionen in oder auf den verschiedenen Nährmedien zu ermitteln, wurden sowohl Nativ-Präparate als auch mit 1 : 4 verdünnter Karbolfuchsin-Lösung und nach Gram gefärbte Ausstrich-Präparate angefertigt.

Die Nativ-Präparate wurden phasenkontrast-mikroskopisch bei Vergrößerungen von 1 : 400 und 1 : 600 (Binokulares Standard-Phasenkontrast-Mikroskop GF 525 der Fa. Zeiss-Winkel; Okulare 10fach und 12fach, Objektiv Achromat Ph 40/0, 65), die gefärbten Ausstriche im Hellfeld mit Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 1 : 600 untersucht.

In den Nativ-Präparaten waren die Vibrionen an ihrer schnellen, ruckartigen Vor- und Rückwärtsbewegung erkennbar, die mitunter an das Bild eines tanzenden Mückenschwarmes besonders dann erinnerte, wenn viele Vibrionen im Präparat vorhanden waren. In Zweifelsfällen brachte die Betrachtung der gefärbten Ausstriche Aufschluß über die Identität der Keime.

Eine Unterscheidung der apathogenen Vibrionen (V. bubulus) von Vibrio fetus war durch die mikroskopische Untersuchung nicht mit Sicherheit möglich, wenn sich auch die durch die biochemische Prüfung als apathogen erkannten Vibrionen gegenüber Vibrio fetus durch kürzere Zell-Formen und größere Beweglichkeit auszuzeichnen schienen.

a) Untersuchung des Keim-Wachstums in halbfesten Medien :

In nahezu allen mit Untersuchungsmaterial beimpften Kultur-Röhrchen war nach 3 - 4tägiger Bebrütung ein üppiges

Keimwachstum erkennbar. Fast stets war die Oberfläche des Nährmediums von einer grauweißlichen bis gelblich-weißen, m. o. w. dicken Membran bedeckt, die sich aus den verschiedensten Keim-Arten zusammensetzte (Mikrokokken, Streptokokken, bewegliche und unbewegliche Kurz- und Langstäbchen, Sporenbildner mit mittel- oder endständigen Sporen u. a.). Das Keimwachstum verursachte im Bereich des seitlichen Impfstiches m. o. w. scharf begrenzte und verschieden starke schleier-artige, wolkige oder flockige, meist grauweißliche Trübungen, die sich oftmals bis in die Mitte der Röhrchen erstreckten. Die Trübungen waren um so ausgedehnter, je höher der Anteil an beweglichen Keimen - vor allem Proteus vulgaris und Pseudomonas-Arten - an der Verunreinigungsflora war. Die Anwesenheit von Pseudomonas aeroginosa zeigte sich durch eine bläulichgrüne Verfärbung des Nährmediums, besonders in der oberen Schicht.

Zunächst wurde die oberflächliche Keimschicht durch leichtes Aufschlagen des schräg gehaltenen Röhrchens auf die Handkante abgeschleudert, so daß dann unter Umgehung dieser Membran Material aus dem Innern des Nährmediums entnommen werden konnte. Von dem Keimwachstum in jedem Röhrchen wurden mindestens vier oft aber mehr Nativ-Präparate mikroskopisch sehr gründlich durchgemustert, denn oft fanden sich die Vibrionen im Präparat nur an einer einzigen, kleinen Stelle. Im übrigen mußten die mikroskopischen Präparate mit aus verschiedenen Zonen des Nährmediums entnommenem Material angefertigt werden, da es sich zeigte, daß das Wachstum der Vibrionen manchmal nur auf einzelne Stellen des Mediums beschränkt war. Da mit dem Material von den Organ-, Präputial-Spül- oder Sperma-Proben stets 2 Röhrchen-Kulturen angelegt worden waren, wurden mithin von den aus jeder Probe gezüchteten Mikroorganismen mindestens 8 mikroskopische Präparate angefertigt und durchgesehen.

b) Untersuchung des Keim-Wachstums auf festen Nährmedien :

Nach der Bebrütung der festen Nährmedien wurde das auf den Platten aufgetretene Kolonie-Wachstum zunächst mit dem freien Auge sowie mit einer Lupe sowohl bei Tageslicht als auch bei künstlicher Beleuchtung untersucht. Später erfolgte die Betrachtung der Kolonien auch mit Hilfe eines Stereo-Mikroskopes bei 16facher Vergrößerung unter Verwendung künstlicher Beleuchtung. Teile vibrioverdächtiger Kolonien wurden mit einer Platin-Nadel auf einem Objektträger in physiologischer NaCl-Lösung verrührt und nach Auflegen eines Deckgläschens phasenkontrast-mikroskopisch geprüft. Bestanden Zweifel an der Identität der ermittelten Keime, so wurden auch hier gefärbte Ausstrich-Präparate untersucht. Konnten keine verdächtigen Kolonien entdeckt werden oder war die Nährboden-Oberfläche durch Verunreinigungskeime überwuchert worden, so wurden mit von mehreren Stellen der Keimschicht entnommenem Material Übersichts-Präparate hergestellt und mikroskopiert.

5. Isolierung der Vibrionen aus verunreinigten Kulturen.

In allen Fällen, in denen Vibrionen in den Röhrchen-Kulturen nachgewiesen werden konnten, die mit Untersuchungsmaterial angezüchtet worden waren, wurde versucht, die Vibrionen in Reinkultur zu isolieren.

Ergab die mikroskopische Untersuchung in positiven Fällen das Vorkommen von Vibrionen in mehreren Röhrchen-Kulturen (Abortus- und Schlachthof-Material), so wurden nur jene Röhrchen für den Versuch der Isolierung dieser Keime zurückbehalten (meist 2 - 3), in denen der relative Anteil der Vibrionen an der gesamten Bakterienflora am größten war. Von den aufbewahrten Primär-Kulturen

wurden eine Reihe von Nativ-Präparaten angefertigt, wobei es ein Präparat mit möglichst viel Vibrionen und wenig Verunreinigungskeimen zu finden galt, das für den Isolierungsversuch erfolgversprechende Voraussetzungen bot. Von solchen Präparaten wurde das nach dem Abheben des Deckglases auf diesem und dem Objektträger haftende Material mit einer Öse aufgenommen und fraktioniert auf feste Nährmedien verimpft. Auf diese Weise wurde versucht, eine laufende Verdünnung des Impfmaterials und damit das Wachstum von Einzelkolonien zu erzielen. Als feste Nährmedien wurden Blutagar- und Schokolade-Blutagar-Platten benutzt, deren Beimpfung in der Reihenfolge Schokolade-Blutagar, Blutagar, Schokolade-Blutagar, Blutagar usw. erfolgte. Im allgemeinen wurden bei jedem Versuch vier, mitunter aber auch mehr Platten verwendet, je nach der Zusammensetzung des Impfmaterials.

Konnten aus den Primär-Kulturen nur solche Präparate gewonnen werden, in denen gegenüber Verunreinigungskeimen nur relativ wenig Vibrionen enthalten waren, so wurden mit dem Material von den vibrionen-reichsten Präparaten jeweils 2 - 3 halbfestes Thiol-Medium (0,5 % Agar-Gehalt) enthaltende Röhrchen beimpft. Nach 2 - 3 tägiger Bebrütung wurden 1 oder 2 dieser Subkulturen erneut auf Eignung als Ausgangsmaterial für den Versuch geprüft, die Vibrionen durch Verimpfung auf feste Nährmedien und Erzielung des Wachstums in Einzelkolonien in Reinkultur zu isolieren. Die Subkultivierung und versuchte Anreicherung der Vibrionen wurde in dieser Weise so lange fortgesetzt, bis der Versuch der Isolierung der Vibrionen in Reinkultur entweder gelang oder aber als aussichtslos aufgegeben wurde.

In jedem Fall wurden 1 - 2 Röhrchen der Primär- und der Subkulturen, in denen Vibrionen nachgewiesen werden konnten, bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nach 5 - 6 Tagen abermals untersucht. GAUTHIER u. CHEVÉ (45)

berichteten nämlich, daß ein mäßiges Wachstum der Begleitbakterien das der Vibrionen in Primär-Kulturen nicht wesentlich beeinflußt; eigenartigerweise vermehrten sich die Vibrionen in den einige Zeit lang aufbewahrten Primär-Kulturen sogar stärker als die Begleitkeime, so daß sie nach 3wöchiger Aufbewahrung in der Kultur vorherrschten.

Die beimpften Platten wurden 3 Tage bei 37°C in einer 10 - 15 % CO_2 enthaltenden Atmosphäre bebrütet und anschließend auf das Wachstum der Vibrionen in Einzelkolonien untersucht. Konnten Einzelkolonien ermittelt werden, so wurde ein Teil davon in je 2 - 3 Röhrchen mit Bacto-Thiol-Medium und Leber-Leberbouillon übertragen und darin 3 - 4 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet.

Der Brillantgrün-Blutagar wurde erst entwickelt, als die Untersuchungen an dem Abortus- und Schlachthof-Material bereits abgeschlossen waren.

6. Biochemische Untersuchungen.

Das biochemische Verhalten aller im Rahmen dieser Arbeit isolierten Vibrionen-Stämme und vibrionen-ähnlichen Mikroorganismen sowie einer Anzahl von Vibrionen-Laboratoriums-Stämmen (Bayer. Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung) wurde nach folgenden Methoden geprüft. Vorher wurden die Vibrionen jedoch nochmals in Bacto-Thiol-Medium überimpft und 3 Tage bei 37°C in normalem Brutschrank-Milieu bebrütet. Vor und nach jedem Versuch wurden die Kulturen auf Reinheit geprüft.

Katalase-Aktivität : Zur Ermittlung der Katalase-Aktivität der Vibrionen-Stämme wurden die 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen in Bacto-Thiol-Medium (Difco) bebrüteten Vibrionen-Kulturen mit gleichen Mengen einer 3%igen H_2O_2-Lösung (aus 1 Teil

30%iger H_2O_2-Lösung und 9 Teilen Aqua dest. hergestellt) versetzt. Anschließend wurden die genormten Kultur-Röhrchen sofort mit von einer Kapillare durchbohrtem Gummistopfen verschlossen und ihr Inhalt durch mehrmaliges Kippen der Röhrchen vermischt, wobei die Öffnung des Kapillar-Röhrchens zugehalten wurde. Sodann wurden die Kultur-Röhrchen mit dem Verschluß nach unten vertikal in einen Ständer abgestellt, nachdem das Niveau des Flüssigkeitsspiegels in den Röhrchen mit einem Fettstift am Glas markiert worden war. Die Ablesung der Reaktion erfolgte nach 5, 10 und 20 Minuten.
Der positive Ausfall des Katalase-Aktivitäts-Testes war daran zu erkennen, daß der von den Vibrionen durch ihre Katalase-Aktivität aus dem Wasserstoffperoxyd freigesetzte Sauerstoff perlenartig an die Flüssigkeitsoberfläche stieg. Der zunehmende Sauerstoffdruck verdrängte die Flüssigkeit aus dem Röhrchen, wobei das Flüssigkeits-Niveau entsprechend der Menge des freigesetzten Sauerstoffes sank. Die Differenz zwischen Niveau 1 und Niveau 2 wurde in Millimetern gemessen und als "Katalase-Zahl" notiert. Vibrionen-Stämme mit einer Katalase-Zahl kleiner als "5" wurden als katalase-negativ betrachtet.

Der Katalase-Aktivitäts-Test in dieser Form ist zuerst von BRYNER u. FRANK (18) beschrieben worden.

H_2S-Bildung : Die Prüfung auf Schwefelwasserstoff-Bildung erfolgte mit Hilfe des Kligler-Eisensulfat-Agars[1], wobei allerdings auf den Zusatz von Zuckerarten zu dem Test-Medium verzichtet wurde. Für die gleichzeitige Prüfung der Urease-Aktivität wurde dem Medium jedoch in Anlehnung an das Rezept von BADER u. HOTZ[2] Harn-

---

1) R.-E. Bader, Zschr. Hyg., 131 (1950) : 157
2) R.-E. Bader u. G. Hotz, Zschr. Hyg., 133 (1951) : 20
1 u. 2 zit. nach L. Hallmann: Bakteriologische Nähr-

stoff zugesetzt.

Rindfleischwasser	1000 ml
Pepton "Merck"	20,0 g
Agar	15,0 g

Die Mischung wird erhitzt und gründlich gelöst. Zur Klärung des Nähragars wird derselbe nach seiner Abkühlung auf etwa 65°C mit dem geschlagenen Weiß eines Hühnereies versetzt, kräftig geschüttelt, 45 Minuten lang im Dampftopf gekocht und anschließend filtriert. Die Reaktion des Mediums wird bei etwa 55°C auf pH 7,4 eingestellt. Sodann gibt man zu:

10 ml Eisen-II-sulfat-Lösung	(2,0 g $FeSO_4$ in 100 ml kaltem Aqua dest. lösen),
10 ml Natriumthiosulfat-Lösung	(0,8 g $Na_2S_2O_3$ in 100 ml kaltem Aqua dest. lösen),
10 ml Natriumsulfit-Lösung	(4,0 g Na_2SO_3 in 100 ml kaltem Aqua dest. lösen),
20 ml Indikator-Lösung	(0,1 g Phenolrot (Phenolsulfthalein) in 10 ml warmem 96%igem Alkohol lösen u. 90 ml warmes Aqua dest. zugeben).

Das Substrat wird gut gemischt und 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Anschließend gibt man 2,0 g Harnstoff zu und mischt abermals sehr gründlich. Danach wird das Medium zu je 4 ml in sterile Röhrchen abgefüllt und erneut 10 Minuten im Dampftopf sterilisiert (bei längerer Erhitzung tritt bereits eine Zersetzung des Harnstoffs ein). Die Röhrchen läßt man so in Schräglage erstarren, daß eine etwa 3 cm hohe Kuppe und eine etwa gleichlange Schrägfläche entstehen. Der fertige Prüf-Agar ist von rosaroter Farbe

---

böden, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953 S. 119 und 124.

Die Test-Röhrchen wurden durch Anlegen einer Oberflächen- und Stichkultur mit einer Öse (3 mm ∅) voll frischer Vibrio-Kultur (aus Thiol-Medium) beimpft und 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet. Die Kontrolle der Kulturen auf H_2S-Bildung wurde in 24stündigen Abständen vorgenommen.

Die Bildung von H_2S war an einer sehr deutlichen Schwarzfärbung des Mediums im Bereich des Impfstiches (meist schon nach 12stündiger Bebrütung), die Spaltung von Harnstoff an einer m. o. w. intensiven Rotfärbung der gesamten Kultur erkennbar.

Nitrat-Reduktion: Für die Prüfung der Vibrionen hinsichtlich ihres Vermögens, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, wurde das von BRYNER u. FRANK (18) beschriebene Test-Nährmedium verwendet:

Aqua dest.	1000 ml
Pepton "Merck"	10,0 g
NaCl	5,0 g
Fleisch-Extrakt ("Liebig")	3,0 g
$NaNO_3$	1,0 g

Die Mischung wird erhitzt und die darin enthaltenen Substanzen gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgt bei etwa 55°C. Nach dem Abfüllen zu je 5 ml in Röhrchen wird das Medium 15 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Test-Röhrchen wurden mit einer Öse (3 mm ∅) voll frischer Vibrio-Kultur (aus Thiol-Medium) beimpft und 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet. Anschließend wurde die Nitrat-Reduktion - soweit eine solche stattgefunden hatte - nach der Methode von PFEIFFER[1] mit dem Nitrin-Reagens

---

[1] bei L. Hallmann:
Bakteriologie und Serologie;
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Aufl. 1955

"Merck"[1] (o-Aminobenzalphenylhydrazon) nachgewiesen. Herstellung der Gebrauchs-Lösung :
2,0 g Nitrin werden unter Zusatz von 2 ml 10%iger Salzsäure in 100 ml 96%igem Methylalkohol gelöst.

Die bebrüteten Kulturen (je 5 ml) wurden jeweils mit 3 ml 25%iger Schwefelsäure und 2 ml 96%igem Äthylalkohol versetzt und geschüttelt. Nach Zusatz einiger Tropfen Nitrin-Lösung trat bei Gegenwart von Nitrit sofort eine rotviolette Färbung auf, die nach kurzer Zeit (2. Reaktionsphase) über Rotbraun und Braun nach Gelb oder Dunkelgelb überging. Bei Gegenwart größerer Nitritmengen trat die Gelbfärbung gleich ein.

Gelatine-Verflüssigung : Um eine weitere Möglichkeit für die Differenzierung der isolierten Vibrionen und vibrioähnlichen Mikroorganismen zu haben, wurden diese Keime auch auf ihr Verhalten gegenüber Gelatine geprüft.

1000 ml Nährbouillon mit 0,1 % Agar-Gehalt (1000 ml Rindfleischwasser + 10,0 g Pepton "Merck" + 5,0 g NaCl + 1,0 g Agar) mit dem pH-Wert 7,2 werden 150,0 g Gelatine zugesetzt. Nach KUZDAS u. MORSE (77) ist der Agar-Zusatz notwendig, da Vibrio fetus und die bovinen apathogenen Vibrionen in Nährgelatine nur dann wachsen, wenn diese 0,1 % Agar enthält. Man läßt die Gelatine zunächst 2 Stunden in der kalten Bouillon quellen und kocht die Mischung dann bis zur völligen Lösung im Dampftopf (ca. 1 Stunde). Nach dem Abkühlen im kalten Wasserbad auf etwa 60°C wird der pH-Wert überprüft und die Nährgelatine zur Klärung mit einem geschlagenen Hühnereiweiß versetzt, kräftig geschüttelt, nochmals 45 Minuten im Dampftopf gekocht, durch ein Faltenfilter filtriert und zu je 8 ml in Röhrchen abgefüllt. Die Sterilisation erfolgt je 15 Minuten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf, wonach die Röhrchen jeweils

[1] Chemische Fabrik E. Merck AG, Darmstadt

sofort in kaltem Wasser abgekühlt werden.

Von jedem zu prüfenden Stamm wurden 2 Röhrchen mit je einer Öse (1 mm Ø) voll frischem Kulturmaterial durch Stich beimpft. Eins der Röhrchen wurde bei 37°C im normalen Brutschrankmilieu bebrütet und das andere bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) gehalten. Nach 5 Tagen wurden beide Röhrchen auf Keimwachstum untersucht und dann in den Kühlschrank gestellt, um zu sehen, inwieweit sich die Nährgelatine wieder verfestigt.

NaCl-Toleranz : Da KUZDAS u. MORSE (77) ermittelt hatten, daß Vibrio fetus bei einer NaCl-Konzentration von 3,5 % im Nährmedium kein, apathogene bovine Vibrionen (V. bubulus) hingegen noch ein gutes Wachstum zeigen, wurden die isolierten Vibrionen auch auf ihre Toleranz gegenüber Kochsalz in Bacto-Thiol-Medium geprüft, dessen NaCl-Gehalt durch Zugabe von 30,0 g NaCl/1000 ml Medium auf 3,5 % erhöht worden war.

Nach der Beimpfung mit je einer Öse (3 mm Ø) voll Vibrio-Kultur wurden die Thiol-Röhrchen 7 Tage bei 37°C in normalem Brutschrankmilieu bebrütet und in 24stündigen Abständen auf das Wachstum der Vibrionen kontrolliert.

Für weitere Untersuchungen fanden Conradi-Drigalski-, Endo- und Kauffmann-Agar-Platten Verwendung, die nach ihrer Beimpfung jeweils 3 - 5 Tage bei 37°C in einer mit ca. 15 % CO_2 angereicherten Atmosphäre bebrütet wurden.

7. Serologische Untersuchungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten serologischen Untersuchungen erstreckten sich auf die Prüfung des agglutinatorischen Verhaltens der isolierten Vibrionen-Stämme gegenüber dem Cervico-Vaginal-Schleim vibrio-fetus-infizierter Kühe.

a) Antigen-Gewinnung :

Zur Antigen-Gewinnung wurden die Vibrio-Stämme zunächst 3 Tage in Bacto-Thiol-Medium bebrütet und anschließend auf Frischblutagar- und "Schokolade"-Blutagar-Platten überimpft. Die Bebrütung der Platten erfolgte 3 Tage bei 37°C in einer mit ca. 15 % CO_2 angereicherten Atmosphäre. Danach wurden die Platten auf Reinheit der Kultur überprüft und mit Formol-Kochsalz-Lösung abgeschwemmt (physiologische NaCl-Lösung + 0,3 % Formalin).

Die Antigen-Suspension wurde durch sterile Gaze in Zentrifugier-Röhrchen gefüllt und 10 Minuten bei 1000 U./Min. zentrifugiert. Anschließend wurde die überstehende Flüssigkeit in neue Zentrifugier-Röhrchen abgegossen und 30 Minuten bei 4000 U./Min. zentrifugiert. Dann wurde die überstehende Flüssigkeit weggegossen und der Bodensatz in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und erneut 30 Minuten bei 4000 U./Min. zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde der Bodensatz mit Formalin-Kochsalz-Lösung aufgeschwemmt. Danach erfolgte die Einstellung der Dichte der Antigen-Suspension so, daß sie der Dichte einer Bariumsulfat-Lösung entsprach, die durch Mischen von 3 ml 1%iger Bariumchlorid-Lösung mit 97 ml 1%iger Schwefelsäure hergestellt worden war.
Die Antigen-Suspension wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Gewinnung von Cervico-Vaginalschleim von vibrio-fetus-infizierten Kühen :

Der Vaginalschleim wurde von Sterilitäts-Tierärzten des Rindergesundheitsdienstes nach der Pipetten-Methode und nach der STEGER' schen Vaginal-Spülmethode gewonnen. Für die serologischen Untersuchungen wurde nur solcher Schleim verwendet, der im Muco-Agglutinations-Test mit dem an der Landesanstalt verwende-

ten Standard-Test-Antigen auf Vibrio fetus eindeutig positiv reagierte. Die Vorbereitung der überbrachten Schleimproben erfolgte in der Weise, daß der Schleim in einer Griffith' schen Röhre homogenisiert, anschließend für einige Stunden in den Brutschrank gestellt und dann 10 Minuten bei 3000 U./Min. auszentrifugiert wurde, um eine klare Flüssigkeit zu erhalten.

c) Durchführung des Röhrchen-Agglutinations-Tests:

Für die Prüfung der isolierten Vibrionen-Stämme wurden jeweils die folgenden 5 Verdünnungen angesetzt :

	Schleim	physiol. NaCl-Lsg.	Antigen
Röhrchen 1	0,5 ml	---	0,5 ml
Röhrchen 2	0,4 ml	0,1 ml	0,5 ml
Röhrchen 3	0,3 ml	0,2 ml	0,5 ml
Röhrchen 4	0,2 ml	0,3 ml	0,5 ml
Röhrchen 5	0,1 ml	0,4 ml	0,5 ml

Die Röhrchen wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C gehalten; nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Ablesung der Reaktionen.

B. Untersuchungs - Ergebnisse

1. Abortus-Material.

Bei seinen Untersuchungen hat GRÖGEL (50) in abortierten Rinder-Feten und in Nachgeburten, die aus Abortus-Fällen beim Rind stammten, durch ein kulturelles Anreicherungs-Verfahren auffallend häufig Vibrionen nachweisen können. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen galt es, nochmals einen Überblick über das zahlenmäßige Vorkommen von Vibrionen in abortierten Rinder-Feten zu erhalten. Gleichzeitig

und in besonderem Maße interessierte die Frage, in welchen Organen solcher Feten Vibrionen überhaupt vorkommen und inwieweit die einzelnen fetalen Organe für den Nachweis dieser Mikroorganismen geeignet sind.

Zu diesem Zweck wurden 57 abortierte Rinder-Feten verschiedenen Entwicklungsalters und verschiedener Beschaffenheit, darunter vier Zwillinge, bakteriologisch auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht (= 55 Abortus-Fälle).
Die Feten stammten aus verschiedenen Stadien der Trächtigkeit. Nach den Angaben in den Begleitschreiben und auf Grund ihrer Größen- und Entwicklungsverhältnisse waren 22 Feten in der 1. Hälfte (1 - 4 Monate) und 33 Feten in der 2. Hälfte (5 - 9 Monate) der Trächtigkeit abortiert worden (siehe Tab. I).

Tabelle I: Entwicklungsalter der auf das Vorkommen von Vibrionen untersuchten abortierten Feten.

Alter des Fetus	Zahl der untersuchten Fälle	
	Summe	Vibrionen bei
bis 1 Monat	1	-
1 - 2 Monate	4	3
2 - 3 Monate	7	4
3 - 4 Monate	10	6
4 - 5 Monate	8	5
5 - 6 Monate	10	7
6 - 7 Monate	7	3
7 - 8 Monate	4	2
8 - 9 Monate	4	2
S u m m e	55	32

Wenn auch danach getrachtet wurde, Material von allen Organen der Feten einzeln kulturell zu untersuchen, so war dies jedoch aus verschiedenen Gründen nicht in jedem Fall möglich. Deshalb sollen die Untersuchungsergebnisse in zwei Gruppen wiedergegeben werden, um sie so besser überblicken und beurteilen zu können.

Die Untersuchungsergebnisse der in Gruppe I und II besprochenen Fälle sind in den Tabellen II a und II b mit sonstigen Einzelheiten zusammengestellt. Die vibriopositiven Fälle aus Gruppe I (Tabelle II a) sind nochmals in Tabelle III zusammengefaßt, um die einzelnen Befunde im ganzen besser überblicken zu können. Die Tabellen finden sich im Anhang der Arbeit.

Gruppe I (Tab. II a u. Tab. III) umfaßt 45 Feten, von denen mit Ausnahme von drei Feten alle Organe untersucht wurden, nämlich Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magen, Darm, Gehirn und, soweit verfügbar, die Secundinae. Bei Fetus Nr. 623 (Fetus angefressen) konnten Niere und Milz, bei Fetus Nr. 663 (totale Mumifikation) Niere, Milz und Darm, bei Fetus Nr. 748 (totale Mumifikation) der Darm nicht untersucht werden. Bei Fetus Nr. 663 wurde aber zusätzlich aus Brust- und Bauchhöhle und bei Fetus Nr. 748 aus der Bauchhöhle entnommenes Material angezüchtet. Bei 28 Feten konnten die zugehörigen Secundinae und bei einem dieser Feten auch das Fruchtwasser untersucht werden.

Gruppe II (Tab. II b) umfaßt 12 Feten, darunter vier Zwillinge, von denen folgendes Material untersucht wurde : Secundinae, Fruchtwasser, Querschnitt des Fetus, Bauchhöhle, Leber (nicht bei Fetus T 218 und T 219) und Gehirn (nicht bei Fetus T 218 und T 219). Bei den Feten dieser Gruppe war es infolge mangelhafter Ausbildung der Organe (Frühaborte) oder infolge Mumifikation oder Mazeration der Feten nicht möglich, die einzelnen Organe zu unterscheiden bzw. sie kulturell

zu verarbeiten, so daß sich hier die Untersuchung lediglich auf einzelne Organe und den Bauchhöhleninhalt als Ganzes erstreckte.

Mit dem aus jedem untersuchten Organ entnommenen Material wurden jeweils zwei Kultur-Röhrchen beimpft; somit wurden also pro Fetus aus Gruppe I meist 18 und pro Fetus aus Gruppe II meist 12 Kulturen angelegt.

In dem aus insgesamt 55 Abortus-Fällen bei Rindern stammenden Untersuchungsmaterial wurden in 32 Fällen (= 58,18 %) Vibrionen kulturell nachgewiesen.

In 5 dieser Fälle konnten die Vibrionen auch mikroskopisch ermittelt werden, und zwar in Ausstrich-Präparaten, die mit von den Secundinae (Cotyledonen) und/oder aus dem Mageninhalt angefertigt und nach Gram sowie mit 1 : 4 verdünntem Karbolfuchsin gefärbt worden waren (Nrn. 650, 726, 748, 750, 774).

In 3 Fällen konnten die Vibrionen nur aus den Secundinae, nicht aber aus den Feten selbst herausgezüchtet werden (Nrn. 784, T 218, T 229). Umgekehrt waren diese Keime in 3 anderen Fällen nur in den Feten, nicht aber in den zugehörigen Secundinae kulturell nachweisbar (Nrn. 751, 788, 572).

Gruppe I (Tab. II a u. Tab. III): In den verschiedenen Organen von 24 der 45 in dieser Gruppe zusammengefaßten Feten wurden Vibrionen durch den Kulturversuch nachgewiesen. Bei einem weiteren Fetus (Nr. 784) waren die Vibrionen nur in den zugehörigen Secundinae, nicht aber in einem der fetalen Organe nachweisbar.

Zur Klärung der Frage, wie häufig und in welchen Organen abortierter Rinder-Feten Vibrionen durch den Kulturversuch nachweisbar sind, werden nur die Befunde verwertet, die durch die kulturelle Untersuchung der in dieser Gruppe zusammengefaßten Feten erhalten wurden, von denen mit

3 Ausnahmen stets alle Organe zu verarbeiten waren. Es ergab sich, daß die Vibrionen aus jeder der untersuchten Organ-Arten herausgezüchtet werden konnten, und zwar

in 23	Fällen	aus dem	Mageninhalt	= 92 %	der vibrio-positi-
" 15	"	" "	Darminhalt	= 62,5 %	" ven Fälle
" 12	"	" "	Gehirn	= 48 %	"
" 12	"	" den	Nieren	= 50 %	"
" 10	"	" der	Leber	= 40 %	"
" 10	"	" dem	Herz	= 40 %	"
" 8	"	" der	Lunge	= 32 %	"
" 7	"	" der	Milz	= 29,2 %	"

Da bei einem der vibrio-positiven Feten (Nr. 623) Niere und Milz und bei einem weiteren dieser Feten (Nr. 748)der Darm nicht untersucht werden konnten, liegt die Fehlergrenze bei den für Darm, Niere und Milz angegebenen Prozentzahlen bei ± 2 % (Fehlerbreite = 4 %).

Hinsichtlich der Frage, in wieviel Organen der einzelnen abortierten Feten die Vibrionen gleichzeitig nachweisbar sind, ergab sich, daß die Züchtung dieser Keime gelang

	aus 8	Organen	bei 2	Feten
	" 6	"	" 4	"
	" 5	"	" 4	"
	" 4	"	" 3	"
	" 3	"	" 5	"
	" 2	"	" 4	"
nur	" 1	Organ	" 2	".

Nicht berücksichtigt sind hierbei die Secundinae. Aus 9 der 28 untersuchten und zu den Feten der Gruppe I gehörenden Secundinae konnten Vibrionen herausgezüchtet werden, und zwar gehörten 8 dieser 9 Secundinae zu Feten, aus denen sich die Vibrionen ebenfalls züchten ließen, während in einem Fall in dem zugehörigen Fetus diese Keime nicht nachweisbar waren (Nr. 784). Umgekehrt gelang es

in 2 Fällen nicht, die Vibrionen in den Secundinae nachzuweisen, obwohl diese Keime in den zugehörigen Feten ermittelt wurden (Nrn. 751 , 788).

Gruppe II (Tab. II b) : In dem Material von 7 der 10 in dieser Gruppe zusammengefaßten Abortus-Fälle wurden Vibrionen durch den Kulturversuch nachgewiesen. Hierbei konnten die Vibrionen in 2 Fällen nur aus den Secundinae, nicht aber aus den zugehörigen Feten selbst herausgezüchtet werden (Nrn. T 218 , T 229). In einem anderen Fall gelang der kulturelle Nachweis der Vibrionen dagegen nur im Fetus, jedoch nicht in den zugehörigen Secundinae (Nr. 572). Mit dem in dieser Gruppe in allen Fällen untersuchten Fruchtwasser glückte der kulturelle Nachweis der Vibrionen in den vibrio-positiven Fällen 4-mal, während er 3-mal mißlang.

Hinsichtlich der Häufigkeit des kulturellen Nachweises von Vibrionen in den verschiedenen Proben ergab sich, daß diese Keime gezüchtet werden konnten

in 6 Fällen	aus den Secundinae	= zu	85,7 %
" 4 "	" dem Fruchtwasser	= "	59,1 %
" 5 "	" dem Querschnitt des Fetus	= "	71,4 %
" 5 "	" der Bauchhöhle " "	= "	71,4 %
" 5 "	" der Leber " "	= "	83,3 %
" 4 "	" dem Gehirn " "	= "	66,7 %.

Die Prozentzahlen sind bezogen auf die Zahl der vibrio-positiven Fälle. Da Leber und Gehirn in einem dieser Fälle nicht untersucht wurden, liegt die Fehlergrenze bei den für die genannten Organe angegebenen Prozentzahlen bei etwa ±7 % (Fehlerbreite etwa 14 %).

In dieser Gruppe gelang die Züchtung der Vibrionen

	aus 6 Proben	in 3	Fällen
	" 5 "	" 1	Fall
	" 4 "	" 1	Fall
nur	" 1 Probe	" 2	Fällen.

Die Verimpfung des aus den verschiedenen Organen der Feten und aus den Cotyledonen sowie aus dem Fruchtwasser entnommenen Materials in jeweils 2 Kultur-Röhrchen, die halbfestes Thiol-Medium enthielten, erwies sich für einen annähernd sicheren Nachweis von Vibrionen im Untersuchungsmaterial als unbedingt notwendig. Dies geht deutlich aus folgender Aufstellung hervor, die zeigt, wie oft sich die Vibrionen nur in einer der beiden angelegten Kulturen nachweisen ließen :

Ausgangsmaterial	V. in 2 Kulturen	V. nur in 1 Kultur
Herz	7 x	3 x
Lunge	4 x	4 x
Leber	5 x	5 x
Niere	6 x	6 x
Milz	1 x	6 x
Magen	16 x	7 x
Darm	8 x	7 x
Gehirn	8 x	4 x
Secundinae	14 x	2 x
S u m m e	69	44

In dem von insgesamt 55 Abortus-Fällen bei Rindern stammenden Untersuchungsmaterial wurden also in 32 Fällen (= 58,18 %) Vibrionen kulturell nachgewiesen.

Durch die gleichzeitig vorgenommene mikroskopische und kulturelle Routine-Untersuchung wurden in dem gleichen Untersuchungsmaterial, abgesehen von Vibrionen, folgende Keime ermittelt, die bei Rindern Aborte verursachen können :

Brucella abortus	in 5 Fällen
Schimmelpilze	" 2 Fällen
Streptokokken	" 4 Fällen

Staphylokokken	in 1 Fall
Diplokokken	" 1 Fall
Corynebact. pyogenes	" 1 Fall
E. coli	" 5 Fällen
Streptokokken + E. coli	" 1 Fall
Staphylokokken + E. coli	" 1 Fall.

In den übrigen 34 Fällen konnten keine spezifischen Keime nachgewiesen werden, wenn man die Vibrionen außer Betracht läßt.

In 11 Fällen fanden sich die Vibrionen gleichzeitig neben anderen Keimen, und zwar

1 x neben	Brucella abortus
1 x "	Schimmelpilzen
4 x "	Streptokokken
1 x "	Diplokokken
3 x "	E. coli
1 x "	Streptokokken und E. coli.

In den übrigen 21 Fällen waren neben den Vibrionen keine anderen spezifischen Keime nachweisbar.

Die Untersuchungen ergaben, daß Vibrionen bei in allen Stadien der Trächtigkeit abortierten Feten vorkommen können (siehe Tab. I auf S. 150). Durch den Kulturversuch wurden Vibrionen im Untersuchungsmaterial von 13 der 22 im Frühstadium (1. - 4. Monat) und von 19 der 33 im Spätstadium (5. - 9. Monat) der Trächtigkeit eingetretenen Aborte nachgewiesen. Das entspricht einem Verhältnis von 59,1 % vibrio-positiver Fälle bei den Früh-Aborten gegenüber 57,5 % vibrio-positiver Fälle bei den Spät-Aborten.

Die Vibrionen konnten nicht nur aus gut erhaltenem und frischem, sondern auch aus in Zersetzung befindlichem und sogar aus total mumifiziertem Material herausgezüchtet werden. In 11 der 32 vibrio-positiven Fälle wies

das Untersuchungsmaterial verschiedene Grad der Mumifikation auf.

Abgesehen von Zersetzungs- und Mumifikationserscheinungen wurde bei den vibrio-positiven Feten eine sulzige Infiltration des subkutanen Bindegewebes beobachtet, vor allem bei Feten, die im Frühstadium der Trächtigkeit abortiert worden waren. Bei älteren Feten waren diese Infiltrationen mehr serös-hömorrhagischer Art. Oftmals war in der Bauchhöhle der Feten eine mitunter beträchtliche Menge blutig-seröser Flüssigkeit festzustellen; in diesen Fällen enthielt die Brusthöhle meist ebenfalls eine gleichartige Flüssigkeit, wenn auch nicht in solcher Menge. In den Mägen der Feten fand sich meist ein schleimiger, mit gelblichen Bröckchen vermischter Inhalt, der manchmal auch dunkelgrüne, linsen- bis dattelkerngroße Bröckchen fester Konsistenz enthielt (Mekonium). Gelegentlich zeigten die Leber und die Nieren eine brüchige oder schmierige Beschaffenheit, die auf Zersetzungsprozesse zurückzuführen sein dürfte. Die anderen fetalen Organe wiesen in der Regel keine Veränderungen auf.
An den von Früh-Aborten stammenden Secundinae waren häufig starke Ödeme und ausgedehnte eitrige Einschmelzungen erkennbar.

In nahezu allen mit Untersuchungsmaterial beimpften Kultur-Röhrchen war nach 3 - 4tägiger Bebrütung ein meist üppiges Keimwachstum zu beobachten, das nicht nur im Bereich des Impfstiches auftrat, sondern sich auch mehr oder weniger weit in dessen Umgebung erstreckte (siehe S. 139) . Entgegen der ursprünglichen Annahme, daß die Vibrionen infolge ihrer Beweglichkeit vom Impfstich aus in die Umgebung desselben ausschwärmen und sich dadurch in gewisser Weise von der Begleitflora trennen würden, mußte festgestellt werden, daß dies meist nicht der Fall war. WEIKL (175) hatte bereits ähnliche Beobachtungen gemacht. Vielmehr vermehrten sich die Vibrionen be-

sonders im Bereich des Impfstiches. Waren in der Verunreinigungsflora Proteus- und Pseudomonas-Arten oder andere bewegliche Keime enthalten, so drangen zwar diese Keime mehr oder weniger weit in das Nährmedium vor, doch fanden sie sich stets in gleichem Maße auch im Bereich des Impfstiches.

Um die Vibrionen in Reinkultur aus der Verunreinigungsflora isolieren zu können, mußte der relative Anteil der Vibrionen mindestens 60 % betragen und um so höher sein, je mehr bewegliche Keime sich gleichzeitig in der Kultur fanden. Andernfalls bestand keine Aussicht, Einzelkolonien von Vibrionen auf den mit Material aus den Thiol-Kulturen beimpften festen Nährmedien zu erhalten (ein Selektiv-Medium stand bei diesen Reinzüchtungsversuchen noch nicht zur Verfügung).

Aus den einzelnen Kultur-Röhrchen mußten meist 5 - 6 Proben von verschiedenen Stellen entnommen und mikroskopiert werden, um geeignetes, d. h. relativ viel Vibrionen enthaltendes Material für die Verimpfung auf feste Nährmedien zu erhalten. Da solches Material aus den Primärkulturen meist nicht gewonnen werden konnte, wurde eine Anreicherung der Vibrionen durch wiederholte Subkultivierung möglichst geeigneter Proben in halb-festem Thiol-Medium versucht, die jedoch in vielen Fällen nicht zu dem gewünschten Erfolg führte. Hierbei konnte beobachtet werden, daß die Vibrionen in den Primärkulturen meist länger lebens- und vermehrungsfähig waren als in den Subkulturen.

Wegen der genannten Schwierigkeiten gelang die Isolierung der verschiedenen Vibrionen-Stämme in Reinkultur nur in 14 von den 32 Fällen, in denen diese Keime im Fetus und/oder in den Secundinae nachgewiesen wurden (Tab. II a u. Tab. III : Nrn. 542, 587, 606, 650, 674, 690, 692, 750, 751, 774, 787; Tab. II b : T 255, T 297, 812).

Bei einem der 14 isolierten Vibrionen-Stämme (Stamm 542) handelte es sich um Vibrio fetus; die übrigen 13 Vibrionen-Stämme waren zwar ebenfalls katalase-positiv und H_2S-negativ, doch wurden sie wegen ihres Wachstums unter aeroben Bedingungen als besonderer Vibrio-Typ angesprochen (Einzelheiten über die Differenzierung siehe S. 184).

Die Vibrionen konnten nicht nur aus Feten und Secundinen herausgezüchtet werden, die nur wenige Stunden zuvor abortiert worden waren, sondern auch aus solchen, die erst 4 Tage nach dem Abort zur Anzüchtung kamen.

2. Vom Schlachthof stammendes Material.

Die Untersuchungen von GRÖGEL (50) und die im vorhergehenden Abschnitt 1 wiedergegebenen Befunde haben ein auffallend häufiges Vorkommen von Vibrionen in Feten und Secundinen ergeben, die von Aborten im Früh- und Spätstadium der Trächtigkeit stammten. GRÖGEL (50) hat ferner sogar in 48 % der von ihm untersuchten Nachgeburten von zeitlich normal eingetretenen Geburten Vibrionen nachgewiesen.

Die Feststellung von Vibrionen in Secundinen ohne irgendwelche pathologisch-anatomischen Veränderungen von Normalgeburten und in Abortus-Material, in dem auch andere als Abortus-Erreger beim Rind bekannte Keime nachweisbar waren, ließ die Annahme berechtigt erscheinen, daß es sich in diesen Fällen bei den Vibrionen nicht um ursächlich bedeutungsvolle Erreger handelte. - Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die in solchen Fällen isolierten Vibrionen auf Grund der morphologischen und biochemischen Differenzierung allein als Vibrio fetus anzusprechen waren. - Diese Hypothese zog die Frage nach sich, ob die Vibrionen auch normalerweise im trächtigen Uterus vorkommen oder ob sie lediglich sekundäre nachträgliche Verunreinigungen darstellen.
Um dieses Problem zu klären, wurden 50 nichtabortierte Feten einschließlich ihrer Sekundinen und des Fruchtwas-

sers kulturell auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht. Von den Feten wurden jeweils einzeln angezüchtet : Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magen, Darm. Die Verimpfung des Materials der einzelnen Proben erfolgte in je 2 Kultur-Röhrchen; mithin kamen in jedem Fall insgesamt 20 Kulturen zur Anzüchtung. Hierbei wurde größter Wert auf möglichst sterile Entnahme und Verarbeitung des Untersuchungsmateriales gelegt.

Die trächtigen Uteri, aus denen das Untersuchungsmaterial gewonnen wurde, waren bei der Schlachtung von in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit befindlichen Rindern angefallen (siehe Tab. IV).

Tabelle IV : Entwicklungsalter der auf das Vorkommen von Vibrionen untersuchten nichtabortierten Feten.

Alter des Fetus	Zahl der untersuchten Fälle Summe	Vibrionen und ähnl. Keime bei
bis 1 Monat	-	-
1 - 2 Monate	-	-
2 - 3 Monate	1	-
3 - 4 Monate	1	-
4 - 5 Monate	10	5
5 - 6 Monate	19	5
6 - 7 Monate	13	7
7 - 8 Monate	5	2
8 - 9 Monate	1	1
S u m m e	50	20

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle V im Anhang der Arbeit zusammengestellt, wobei jedoch auf die Anführung der negativen Fälle verzichtet wurde.

In 20 der 50 untersuchten Fälle wurden im Untersuchungsmaterial Vibrionen oder vibrionen-ähnliche Mikroorganismen kulturell nachgewiesen.

Diese Keime konnten aus jeder der untersuchten Proben herausgezüchtet werden, und zwar

in 11	Fällen	aus dem Fruchtwasser
" 5	"	" den Secundinae
" 4	"	" dem Mageninhalt
" 3	"	" dem Darminhalt
" 3	"	" der Lunge
" 2	"	" dem Herz
" 1	Fall	" der Leber
" 1	"	" den Nieren
" 1	"	" der Milz
" 1	"	" dem Gehirn.

Die Züchtung der Keime gelang gleichzeitig

aus	3	Proben	in 4 Fällen
"	2	"	" 4 Fällen
"	1	Probe	"12 Fällen.

Die Fälle, in denen in den Primärkulturen durch die mikroskopische Untersuchung nicht mit Sicherheit Vibrionen oder vibrio-ähnliche Keime nachweisbar waren, wurden als negativ bewertet.

Bemerkenswert ist, daß in den meisten der mit Untersuchungsmaterial beimpften Kultur-Röhrchen nach 3 - 4 tägiger Bebrütung ein mehr oder weniger üppiges Wachstum von vielen nicht näher differenzierten Keimen auftrat, obwohl die Entnahme und Verimpfung der Proben unter möglichst sterilen Kautelen vorgenommen worden war.

Durch diesen Umstand war die Isolierung der Vibrionen und vibrionen-ähnlichen Keime in Reinkultur außerordentlich erschwert. Sie gelang nur in 4 von den 20 Fällen, in denen diese Organismen nachgewiesen wurden (Tab. V : S 11, S 22, S 25, S 40). Versuche, auch die übrigen Stämme reinzuzüchten, mußten nach vierwöchigem erfolglosen Bemühen abgebrochen werden.

Zwei der vier in Reinkultur isolierten Stämme mußten auf Grund der biochemischen Untersuchung zunächst als Vibrio fetus angesprochen werden. Bei der eingehenden Differenzierung der Stämme ergab sich jedoch, daß sie einem besonderem Vibrio-Typ angehören (S 22 u. S 25). Bei beiden übrigen Stämmen (S 11 u. S40) handelte es sich um nichttierpathogene Vibrionen, jedoch nicht um die häufig bei Bullen vorkommenden apathogenen Vibrionen (V. bubulus) (Einzelheiten über die Differenzierung siehe S.184).

3. Präputial-Spülflüssigkeit und Sperma von Bullen.

In der Literatur finden sich häufig Hinweise darauf, daß Vibrionen in Präputial-Spülproben und im Sperma von Bullen oft nur sehr schwer nachweisbar und vor allem in Reinkultur zu isolieren sind, weil in diesen Proben meist eine starke Verunreinigung durch banale Begleitkeime vorkommt.

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen sollte nun ermittelt werden, ob die kulturelle Untersuchung von Präputial-Spülproben oder die von Sperma hinsichtlich des Nachweises und der Isolierung von Vibrionen zu besseren bzw. verläßlicheren Ergebnissen führt und ferner, bei welcher Art der Verarbeitung von Spülproben hierbei die besten Erfolge zu erzielen sind. Gleichzeitig wurden verschiedene Nährmedien hinsichtlich ihrer Eignung für die Isolierung der Vibrionen aus dem Untersuchungsmaterial geprüft. Schließlich galt es, auch ei-

nen Überblick über das zahlenmäßige Vorkommen von Vibrionen bei Besamungs-Bullen im Einzugsgebiet der Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung zu erhalten.

Insgesamt wurde Material von 58 Bullen aus 3 Besamungs-Stationen kulturell untersucht. Während bei allen 58 Bullen Präputial-Spülproben genommen und untersucht werden konnten, stand nur bei 49 Bullen auch das Sperma für eine gleichzeitige Untersuchung zur Verfügung.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen VI, VII und VIII im Anhang der Arbeit zusammengestellt.

Station "A". : Bei 18 der 30 Bullen aus der Station "A". wurden Vibrionen kulturell nachgewiesen (= 60 %) (siehe Tab. VI). Die Vibrionen konnten hierbei nur bei 6 Bullen (20 %) aus der Präputial-Spülprobe, dagegen bei 17 Bullen (56,7 %) aus dem Sperma kultiviert werden. Das Sperma des Bullen "Älpi" konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

Die Züchtung der Vibrionen erfolgte bei 5 Bullen sowohl aus der Präputial-Spülprobe als auch aus dem Sperma, bei einem Bullen ("Welfer") nur aus der Präputial-Spülprobe und bei den übrigen 11 Bullen nur aus dem Sperma.

Bei den positiven Proben waren die Vibrionen mit einer Ausnahme (Sperma-Kultur von "Roland") stets in beiden mit dem jeweiligen Ausgangsmaterial beimpften Kultur-Röhrchen nachweisbar.

In allen mit Untersuchungsmaterial beimpften Kultur-Röhrchen war nach 3 - 4tägiger Bebrütung ein meist üppiges Keimwachstum zu beobachten, das sich aus den verschiedensten Mikroorganismen zusammensetzte (Mikrokokken, Streptokokken, bewegliche und unbewegliche Stäbchen, Sporenbildner mit mittel- oder end-ständigen Sporen, u. a.). Diese Beobachtung konnte auch bei den Kulturen gemacht werden, die mit Material von den Bullen aus den beiden

anderen Stationen angezüchtet worden waren.

In den Primär-Kulturen, die mit von den Bullen "Ponny" und "Werner" stammendem Material angelegt worden waren, war das Nährmedium in seiner oberen Schicht bläulichgrün verfärbt. In beiden Fällen wurde die Verfärbung durch Pseudomonas aeroginosa verursacht.

Um die Vibrionen in Reinkultur isolieren zu können, wurde von den in halbfestem Thiol-Medium angelegten Primär- oder Subkulturen entnommenes vibrio-positives Material auf feste Nährmedien verimpft, wobei in jedem Fall eine Serie von 3 Platten verwendet wurde, nämlich 1 Brillantgrün-Blutagar-Platte, 1 Blutagar-Platte und 1 Schokoladeblutagar-Platte.

Die hierbei erzielten Resultate sind in der folgenden Aufstellung und in Tabelle VI zusammengestellt, in denen jedoch jeweils nur die Platten-Serien aufgeführt sind, bei welchen erstmalig auf einer oder mehreren Platten Vibrionen-Einzelkolonien feststellbar waren.

Nährmedium	Vibrionen-Einzelkolonien	Vibrio-Kolonien überwuchert	negativ
Brill.-Grün-Blutagar	16 x	1 x	1 x
Blutagar	12 x	3 x	3 x
Schokoladeblutagar	13 x	3 x	2 x

Nicht in jedem Falle gelang es beim ersten Versuch, Vibrionen-Einzelkolonien auf einer Platten-Serie zu erhalten, die mit aus den Primär-Kulturen entnommenem Material beimpft worden waren. In 6 Fällen mußten die in Mischkulturen vorliegenden Vibrionen 1 - 2mal in halbfestem Thiol-Medium subkultiviert und solchermaßen angereichert werden, bevor auf den Platten, die mit Material aus den Subkulturen beimpft worden waren, Vibrionen-Einzelkolonien ermittelt werden konnten.

In allen 18 vibrio-positiven Fällen konnten die Vibrionen in Reinkultur isoliert werden.

Station "B.": Bei 14 der 20 Bullen aus der Station "B" wurden Vibrionen kulturell nachgewiesen (= 70 %) (siehe Tab. VII). Die Vibrionen konnten bei diesen 14 Bullen zwar aus den Präputial-Spülproben, jedoch in keinem Fall aus dem Sperma kultiviert werden !! Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß die Sperma-Proben unmittelbar nach ihrer Entnahme angezüchtet worden waren !

Um vergleichen zu können, mit welcher Methode für die Verarbeitung von Präputial-Spülproben hinsichtlich des kulturellen Nachweises von Vibrionen sichere Resultate und sauberere Kulturen zu erhalten sind, wurden mit dem von jeder Spülprobe gewonnenen Material jeweils 4 Kultur-Röhrchen beimpft.

In jedem Fall wurden 2 Röhrchen mit Material beimpft, das in Anlehnung an die von HUBRIG u. Mitarbeitern (62) beschriebene Methode aus der Spülprobe gewonnen worden war (Methode I), während in die 2 übrigen Röhrchen der Bodensatz der zentrifugierten Spülprobe verimpft wurde (Methode II) (siehe S. 127-128 f.). Mit Hilfe der Röhrchen-Kulturen wurde gleichzeitig kontrolliert, ob verläßliche Resultate hinsichtlich des Nachweises von Vibrionen zu erhalten sind, wenn Material aus den Präputial-Spülproben direkt auf festen Nährmedien angezüchtet wird.

Die Vibrionen konnten
in den nach Metnode I beimpften Röhrchen bei 14 Bullen - 11 x in beiden Röhrchen und 3 x in einem Röhrchen - und in den nach Methode II beimpften Röhrchen bei nur 10 Bullen - 5 x in beiden Röhrchen und 5 x in einem Röhrchen - nachgewiesen werden (siehe Tabelle VII).

Aus Tabelle VII ist ersichtlich, daß der relative Anteil der Vibrionen an der Keimflora in den nach Methode I

angelegten Kulturen wesentlich größer als in den nach Methode II angelegten Kulturen war.

Mit dem nach Methode I aus den Präputial-Spülproben gewonnenen Ausgangsmaterial wurde stets gleichzeitig eine Serie verschiedener fester Nährmedien direkt beimpft, die aus 1 Brillantgrün-Blutagar-Platte, 1 Blutagar-Platte und 1 Schokoladeblutagar-Platte bestand.

Die dabei erzielten Resultate sind in Tabelle VII und in der folgenden Aufstellung zusammengefaßt, in der aber nur die Fälle enthalten sind, in denen bei den betreffenden Bullen Vibrionen nachweisbar waren.

Nährmedium	Vibrionen-Einzelkolonien	Vibrio-Kolonien überwuchert	negativ
Brill.-Grün-Blutagar	13 x	-	1 x
Blutagar	6 x	4 x	4 x
Schokoladeblutagar	6 x	3 x	5 x

In allen Fällen, in denen Vibrionen in den Röhrchen-Kulturen nachweisbar waren, wurden die Keime auch auf einer der mit Ausgangsmaterial direkt beimpften Platten ermittelt.

In 13 der 14 vibrio-positiven Fälle konnten die Vibrionen in Reinkultur isoliert werden. Die in der Präputial-Spülprobe des Bullen "Habicht" ermittelten Vibrionen starben nach kurzer Zeit sowohl in der Primär-Kultur als auch in der Subkultur ab, weswegen ihre Reinzüchtung mißlang.

Station "C": Bei 7 der 8 Bullen aus der Station "C" wurden Vibrionen kulturell nachgewiesen (= 87,5 %) (siehe Tabelle VIII). Hier konnten jeweils nur die Präputial-Spülproben der Bullen untersucht werden, da in keinem Falle das Sperma für eine gleichzeitige Untersuchung zur Verfügung stand.

Die Vibrionen konnten
in den nach Methode I beimpften Röhrchen bei 6 Bullen
- in allen 6 Fällen in beiden Röhrchen - und in den nach Methode II beimpften Röhrchen bei 7 Bullen
- 3 x in beiden Röhrchen und 4 x in einem Röhrchen - nachgewiesen werden (siehe Tab. VIII).

In einem Fall ("Pascha") waren Vibrionen nur in einem der beiden nach Methode II angelegten Röhrchen-Kulturen zu ermitteln; die beiden nach Methode I angezüchteten Röhrchen waren vibrio-negativ.

Die gleichzeitige Anzüchtung des nach Methode I aus den Präputial-Spülproben gewonnenen Materials auf verschiedenen festen Nährmedien führte zu folgenden Ergebnissen :

Nährmedium	Vibrionen-Einzelkolonien	Vibrio-Kolonien überwuchert	negativ
Brill.-Grün-Blutagar	3 x	-	4 x
Blutagar 17%ig	2 x	1 x	4 x
Schokoladeblutagar 17%ig	3 x	-	4 x
Blutagar 10%ig	2 x	1 x	4 x
Schokoladeblutagar 10%ig	2 x	-	5 x

Siehe hierzu auch Tabelle VIII.

In einem Fall ("Pascha") ließen sich auf keiner der Platten Vibrionen auffinden, obwohl diese Keime in einem Röhrchen nachgewiesen werden konnten, das mit Material aus der nach Methode II verarbeiteten gleichen Spülprobe beimpft worden war.

Auf den Platten, die mit Material aus den Spülproben der Bullen "Bismarck" und "Heimo" beimpft worden waren, konnten ebenfalls keine Vibrionen ermittelt werden, obwohl in den Kultur-Röhrchen, die mit nach den Methoden I

und II vorbereitetem Material aus den gleichen Spülproben beimpft worden waren, bei beiden Bullen Vibrionen nachgewiesen wurden.

Um die beiden letztgenannten Vibrionen-Stämme ("Bismarck" und "Heimo") in Reinkultur isolieren zu können, wurde aus den Primär-Kulturen entnommenes vibriopositives Material auf feste Nährmedien überimpft. Die aus der Spülprobe des Bullen "Heimo" gezüchteten Vibrionen mußten noch einmal in halbfestem Thiol-Medium subkultiviert und auf diese Weise angereichert werden, bevor sie auf festem Nährmedium in Einzelkolonien erhalten werden konnten.

Vom Stamm "Bismarck" wurden dann auf allen fünf verschiedenen Platten Einzelkolonien der Vibrionen festgestellt, wohingegen Vibrionen-Einzelkolonien vom Stamm "Heimo" wegen der vielen außerordentlich beweglichen Begleitkeime nur auf der Brillantgrün-Blutagar-Platte zu beobachten waren. Auf der 17%igen Schokolade-Blutagar-Platte ließen sich die Vibrionen überhaupt nicht feststellen und auf den übrigen 3 Platten waren sie von den Begleitkeimen überwuchert worden.

Die bei dem Bullen "Pascha" nachgewiesenen Vibrionen konnten nicht in Reinkultur isoliert werden, da sie schon in der ersten Subkultur abstarben, was auf den großen Anteil von Pseudomonas aeroginosa an der Begleitflora zurückzuführen war.

Somit konnten die Vibrionen nur in 6 der 7 vibrio-positiven Fälle in Reinkultur isoliert werden.

Zusammenfassung : Bei insgesamt 39 der 58 Bullen, von denen in allen Fällen Präputial-Spülproben und in 49 Fällen gleichzeitig auch das Sperma kulturell untersucht wurden, konnten Vibrionen nachgewiesen werden.

Bei den 39 vibrio-positiven Bullen wurden die Vibrionen insgesamt in 27 Fällen aus der Präputial-Spülprobe und in 17 Fällen aus dem Sperma herausgezüchtet, wobei dies in 5 Fällen gleichzeitig aus beiden Proben gelang (Spül- und Sperma-Probe). In den 39 vibrio-positiven Fällen mißlang die Züchtung der Vibrionen aus der Präputial-Spülprobe 12 mal (= 30,8 %) und aus der Spermaprobe 15 mal (= 46,9 %, da bei 7 der vibrio-positiven Bullen kein Sperma untersucht werden konnte). Zur besseren Übersicht sind diese Ergebnisse in Tabelle IX zusammengestellt.

Tabelle IX: Kultureller Nachweis von Vibrionen in Präputial-Spülproben von 39 vibrio-positiven Bullen und in Spermaproben von 32 dieser Bullen.

	Station "A" 18 Bullen	Station "B" 14 Bullen	Station "C" 7 Bullen	insges.
Spülprobe pos.	6 x	14 x	7 x	27 x
Spülprobe neg.	12 x	-	-	12 x
Sperma pos.	17 x	-	xxx	17 x
Sperma neg.	1 x	14 x	xxx	15 x
Spülprobe u. Sperma pos.	5 x	-	xxx	5 x

Die Präputial-Spülproben sind innerhalb von 2 - 4 Stunden nach ihrer Entnahme verarbeitet und angezüchtet worden. Das Sperma der Bullen aus der Station "A" ist etwa 2 Tage nach der Entnahme zur Anzüchtung gekommen, wohingegen die Kulturen mit dem Sperma der Bullen aus der Station "B" unmittelbar nach der Gewinnung desselben an-

gelegt worden sind.

Aus den zentrifugierten Präputial-Spülproben der Bullen aus den Stationen "B" und "C" ist das Material für die Verimpfung in halbfestes Thiol-Medium gleichzeitig auf zweierlei Art gewonnen worden, nämlich erstens aus der überstehenden Flüssigkeit (Methode I) und zweitens aus dem Bodensatz (Methode II) (Siehe S. 127 f.)
Die Vibrionen konnten
in den nach Methode I beimpften Röhrchen bei 20 Bullen - 17 x in beiden Röhrchen und 3 x in einem Röhrchen - und in den nach Methode II beimpften Röhrchen bei 17 Bullen - 8 x in beiden Röhrchen und 9 x in einem Röhrchen - nachgewiesen werden (siehe Tab. VII u. VIII).

Die mit dem nach Methode I gewonnenen Impfmaterial angezüchteten Kulturen waren im übrigen weniger durch Begleitkeime verunreinigt als die mit nach Methode II gewonnenem Material angelegten Kulturen.

In 37 der 39 vibrio-positiven Fälle (Bullen) konnten die Vibrionen in Reinkultur isoliert werden (= 94,9 %).

Von diesen 37 Vibrionen-Stämmen wurden auf Grund der Differenzierung nach den bis heute dafür allgemein üblichen Methoden 1 Stamm ("Berto", Station "B") als Vibrio fetus, die übrigen 36 Stämme dagegen als Vibrio bubulus (apathogen) angesprochen.

4. Eignung verschiedener fester Nährmedien für die Anzüchtung von Untersuchungsmaterial zum Nachweis von Vibrionen.

Die Eignung verschiedener fester Nährmedien für die Isolierung von Vibrionen aus Untersuchungsmaterial geht aus der nachfolgenden Aufstellung hervor, in welcher die diesbezüglich in den Tabellen VI, VII und VIII aufgeführten Befunde zusammengefaßt sind. Diese Be-

funde wurden bei der kulturellen Untersuchung der von 39 vibrio-positiven Bullen stammenden Proben erhoben.

Nährmedium	Vibrionen-Einzelkolonien	Vibrio-Kolonien überwuchert	negativ
Brill.-Grün-Blutagar	32 x	1 x	6 x
Blutagar 10%ig	20 x	8 x	11 x
Schokoladeblutagar 10%ig	21 x	6 x	12 x
Blutagar 17%ig	2 x	1 x	4 x
Schokoladeblutagar 17%ig	3 x	-	4 x

Zwar ist nicht aus dieser Aufstellung, wohl aber aus den genannten Tabellen ersichtlich, daß auf den Brillantgrün-Blutagar-Platten entsprechend der Hemmwirkung des Mediums die saubersten, d. h. an Verunreinigungskeimen ärmsten Kulturen zu beobachten waren. Durch Versuche konnte festgestellt werden, daß das Schwärmen von Proteus vulgaris auf diesem Medium 3 - 4 Tage nahezu völlig unterdrückt und auch über diesen Zeitraum hinaus noch merkbar gehemmt wurde, wobei das Wachstum der Vibrionen keine erkennbare Beeinträchtigung erfuhr. Voraussetzung für die Vermeidung einer Ausbreitung des Wachstums von Proteus und anderen stark beweglichen Keimen war eine nicht übermäßige Beimpfung mit verunreinigtem Ausgangsmaterial. Gegenüber Pseudomonas aeroginosa konnte keine bemerkenswerte Hemmwirkung beobachtet werden. Die Blutagar-Platten und Schokoladeblutagar-Platten, die einen Zusatz von 17 % Blut enthielten, erwiesen sich auf Grund hier nicht näher beschriebener Versuche für die Isolierung von Vibrionen aus Untersuchungsmaterial als wenig geeignet, da die Vibrionen-Kolonien auf ihnen sehr häufig von Verunreinigungskeimen überwuchert wurden. Auf den 17%igen Schokoladeblutagar-Platten waren Vibrionen-

Kolonien zudem schlecht erkennbar und meist nur nach längerem, intensivem Suchen aufzufinden.

Bedeutend bessere Ergebnisse waren mit Blutagar-Platten und Schokoladeblutagar-Platten zu erhalten, die nur 10% Blut enthielten.

Auf Bacto-Brillantgrün-Agar (Difco) konnten nur wenige der verschiedenen pathogenen und apathogenen Vibrionen-Stämme gezüchtet werden, mit denen dieses Medium beimpft worden war. War der Nährboden mit Untersuchungsmaterial beimpft worden, so nahm er durch das Wachstum von Verunreinigungskeimen häufig eine so verschiedenartige und starke Verfärbung an, daß es mühevollen und langen Suchens bedurfte, etwa darauf vorhandene Vibrionen-Kulturen zu ermitteln. Infolgedessen erwies sich dieses Nährmedium für die Isolierung und Züchtung von Vibrionen als ungeeignet.

Die hier wiedergegebenen Feststellungen wurden durch weitere Isolierungs- und Kultivierungsversuche bestätigt, bei denen verschiedenartiges Untersuchungsmaterial (abortierte Feten und Secundinae, Präputial-Spülproben) auf den genannten Nährböden angezüchtet worden waren.

Übersicht über die auf ihr kulturelles, biochemisches und serologisches Verhalten untersuchten Vibrionen-Stämme.

Neben den im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Vibrionen-Stämmen wurden vergleichsweise auch verschiedene katalase-positive und katalase-negative Vibrionen-Stämme (V. fetus und V. bubulus) gleichzeitig untersucht, die in der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung gehalten wurden und deren Pathogenität bzw. Apathogenität auf Grund epidemiolo-

gischer Erhebungen bekannt war. Mit Ausnahme von vier Stämmen (Stamm Nr. 241 von Terpstra aus bovinem Abortus-Material, Stämme Nr. 976, 1056 und 1065 von Hubrig aus Präputial-Spülproben von Bullen gezüchtet) sind die Labor-Stämme in der Landesanstalt aus bovinem Abortus-Material, Cervical-Schleimproben von Kühen und Präputial-Spülproben bzw. Sperma von Bullen isoliert worden.

Der Zweck dieser kulturellen, biochemischen und serologischen Untersuchungen war, verwertbare Kriterien für die Differenzierung der aus bovinem Untersuchungsmaterial isolierten Vibrionen zu finden.

Die geprüften Vibrionen-Stämme sind in der auf der nächsten Seite folgenden Aufstellung zusammengefaßt und dabei in drei Gruppen unterteilt. Obwohl durch diese Unterteilung bereits eine gewisse Differenzierung vorweg genommen wird, ist sie jedoch für den Überblick über die später wiedergegebenen Versuchsergebnisse zweckmäßig und vereinfacht die Beschreibung derselben. In Gruppe 4 sind zwei in dieser Arbeit aus normalen (nichtabortierten) Rinder-Feten isolierte Spirillen-Stämme aufgeführt.

Die Nummern bzw. Namen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Stämme sind unterstrichen; bei den nichtunterstrichenen Bezeichnungen handelt es sich um Labor-Stämme.

Gruppe I : Vibrio-fetus-Stämme
(katalase-positiv, H_2S-negativ)

a) aus abortierten Feten (Mageninhalt) und/oder Secundinae (Cotyledonen) durch direkte Züchtung isolierte Stämme :

241, 398, 836, 906, 923, 1029, 1100; 542; 709, 798

b) aus Präputial-Spülproben von Bullen durch direkte Züchtung isolierte Stämme:

976, 1056, 1065

Gruppe II: Aerob wachsende Vibrionen-Stämme (katalase-positiv, H_2S-negativ)

a) aus abortierten Feten und/oder Secundinae (Cotyledonen) mittels Anreicherungs-Verfahrens isolierte Stämme:

5, 73, 108, 122, 125, 150, 156, 157, 163, 246, 253, 310, 312, 363, 383, 386, 513, 592, 598, 601, 804; 587, 606, 650, 674, 690, 692, 750, 751, 774, 787, 812, T 255, T 297

b) aus normalen (nichtabortierten) Feten mittels Anreicherungs-Verfahrens isolierte Stämme:

S 22, S 25

c) aus Cervical-Schleimproben von Kühen mittels Anreicherungs-Verfahrens isolierte Stämme:

80 C, 99 C, 186 C

d) aus Präputial-Spülproben und/oder Sperma von Bullen z. T. durch direkte Züchtung und z. T. mittels Anreicherungs-Verfahrens isolierte Stämme:

29338, "Kämpfer"; "Berto".

Gruppe III : Vibrio-bubulus-Stämme
(katalase-negativ, H_2S-positiv)

aus Präputial-Spülproben und/oder Sperma von Bullen z. T. durch direkte Züchtung und z. T. mittels Anreicherungs-Verfahrens isolierte Stämme:

178 a; 125, "Oskar"; Station "A.": "Attila, Baldur, Baldwin, Benito, Diplomat, Gondart, Graf, Harras, Jall, Mambo, Meister, Niko, Pius, Pollux, Punker, Roland, Theo, Welfer"; Station "B.": "Bagger, Faruk, Hobby, Holm, Kerl, Master, Pamir, Präsident, Pronto, Rex, Senat, Sieger; Station "C.": "Bismarck, Heimo, Holler, Kurier, Maurer, Robin".

Gruppe IV : Spirillen-Stämme aus
normalen (nichtabortierten)
Feten isoliert:

S 11, S 40.

5. Kulturelles Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme.

Die verschiedenen Vibrionen-Stämme wurden vor ihrer Verimpfung in bzw. auf die einzelnen Nährmedien, mit deren Hilfe das kulturelle Verhalten der Stämme untersucht werden sollte, jeweils nochmal in frisches Bacto-Thiol-Medium übertragen und 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet.

a) Verhalten in flüssigem und halbflüssigem Nährmedium :

Diese Nährsubstrate (Leber-Peptonwasser und Bacto-

Thiol-Medium) wurden jeweils mit 1 Standard-Öse (3 mm ø) voll einer frischen, gut gewachsenen Thiol-Kultur beimpft und 3 Tage bei 37°C in normaler Atmosphäre bebrütet.

In Leber-Peptonwasser war sowohl das Wachstum der katalase-positiven Vibrionen (Gruppe I und II) als auch das der katalase-negativen Vibrionen (Gruppe III) makroskopisch nicht oder höchstens als kaum erkennbare Trübung des Nährsubstrates wahrnehmbar.

In Bacto-Thiol-Medium, das mit katalase-positiven Vibrionen (Gruppe I und II) beimpft worden war, konnte das Wachstum der Keime in den Kultur-Röhrchen anfangs makroskopisch an einer von einem etwa 2 - 5 mm unter der Oberfläche des Nährsubstrates liegenden Punkt (Impfstelle) ausgehenden regenschirm- oder fächerartigen Trübung des Mediums erkannt werden. Nach 24stündiger Bebrütung zeigte sich das Keimwachstum in Form einer dünnen Scheibe; die Trübung des Mediums hatte sich hierbei zu einer 1 - 3 mm unter der Oberfläche liegenden grauweißlichen bis elfenbeinfarbigen Schicht verdichtet. Nach weiteren 24 Stunden hatte die Dichte und die Dicke dieser nunmehr unmittelbar unter der Oberfläche des Nährmediums liegenden Schicht zugenommen. Nach insgesamt 72stündiger Bebrütung der Kulturen hatte sich die Wachstumsschicht weiter verdichtet und meist eine Stärke von 2 - 4 mm erreicht, die sich dann aber bei verlängerter Bebrütung nicht mehr oder nur unwesentlich vermehrte. Unterhalb der Wachstumszone blieb das Nährsubstrat in den Kultur-Röhrchen klar. Beim Schütteln der Röhrchen gingen die Trübungen in schleierartige oder wolkige Schlieren über.

Ein Unterschied im Wachstum der Vibrionen der Gruppe I (V. fetus) gegenüber denen der Gruppe II (aerobe Vibrionen) trat insofern auf, als die Wachstumsschicht nach 48-stündiger Bebrütung in den Kulturen der Gruppe I meist nur bis 1 mm, die in denen der Gruppe II aber 1 - 3 mm

dick war. Nach 3 - 4 Tagen belief sich die Dicke dieser Schicht in den Kulturen der Gruppe I im allgemeinen auf maximal 2 mm, wogegen sie in den Kulturen der Gruppe II 2 - 4 mm betrug.

Im weiteren Verlauf war in den Kulturen der meisten Stämme der Gruppe II noch ein geringgradiges Wachstum zu beobachten, das sich in einer zotten- oder schleierartigen Verbreiterung der Wachstumsschicht nach unten zu äußerte. In diesen Fällen erreichte die getrübte Wachstumszone eine maximale Dicke von 5 - 6 mm. In den Kulturen der Stämme aus Gruppe I (V. fetus) war dagegen eine weitere, über 4 Tage hinaus gehende Wachstumszunahme nicht erkennbar.

In den mit katalase-negativen Vibrionen (Gruppe III: V. bubulus) angezüchteten Thiol-Kulturen war das Wachstum der Keime makroskopisch nach 24stündiger Bebrütung daraus ersichtlich, daß sich in den Kultur-Röhrchen etwa 5 - 10 mm unter der Oberfläche des Nährsubstrates eine sehr dünne und feine weißliche, meist elliptische Scheibe gebildet hatte, von der aus sich eine eben wahrnehmbare, hauchartige Trübung des Mediums nach unten bis fast zum Boden der Röhrchen zog. Oberhalb der genannten Scheibe blieb das Nährsubstrat klar. Nach weiteren 24 Stunden war das Medium unterhalb der jetzt dichter und dicker gewordenen Scheibe fast völlig, wenn auch nicht sehr stark getrübt. Nach insgesamt 72stündiger Bebrütung hatte sich die Trübung des Mediums ähnlich wie in den Kulturen der katalase-positiven Stämme zu einer grauweißlichen, etwa 5 mm unterhalb der Oberfläche beginnenden und gewöhnlich 2 mm dicken, nach oben scharf begrenzten Schicht verdichtet, über der das Nährsubstrat klar blieb. Im Gegensatz zu den Kulturen der katalase-positiven Stämme blieb jedoch hier die allgemeine Trübung des Nährmediums bestehen.

Eine deutliche Abweichung von dem Verhalten der Stämme aus den Gruppen I, II und III zeigten zwei der aus normalen, nichtabortierten Feten isolierten Stämme, nämlich die Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV). In Leber-Peptonwasser, mehr aber noch in Thiol-Medium war das Wachstum der beiden Stämme bereits nach 12stündiger Bebrütung makroskopisch an einer dichten grauweißlichen, wolkigen Trübung der oberen Schicht der Nährsubstrate erkennbar, die in den nächsten 24 - 36 Stunden noch zunahm und sich fast völlig über das Nährsubstrat erstreckte. Lediglich in ihrem unteren Teil blieben die Medien in den Röhrchen klar.

Eine Kahmhautbildung war bei keiner Kultur der verschiedenen Stämme der vier Gruppen zu beobachten.

Mikroskopisch wurde ermittelt, daß sich die Vibrionen nach 48stündiger Bebrütung im allgemeinen um das Doppelte des nach 24stündiger Bebrütung festgestellten Wachstumsbetrages vermehrt hatten. Nach 72 Stunden war eine weitere, aber nicht mehr so bedeutende Zunahme der Keimdichte zu beobachten; von diesem Zeitpunkt ab fand augenscheinlich keine wesentliche Vermehrung der Vibrionen in den Kulturen statt. Die Vibrionen der Gruppe II ließen in den Kulturen im Vergleich zu denen der Gruppe I eine stärkere Zunahme der Zelldichte in der gleichen Zeiteinheit erkennen.
In 24 Stunden alten Kulturen der katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I und II) waren meist vorwiegend kurze kommaförmige, nur wenige S-förmige und kaum längere Zellen zu beobachten. In 48 Stunden alten Kulturen herrschten zwar immer noch die kommaförmigen Zellen vor, doch fanden sich jetzt auch vermehrt S-förmige Zellen sowie solche mit 2 - 3 Windungen und einige längere spirilläre Zellgebilde.
72 Stunden alte Kulturen enthielten etwa gleichviel kommawie S-förmige Zellen und zahlreiche spirilläre Zellen mit 4 - 8 und mehr Windungen. Im weiteren Verlauf nahmen die

kurzen Zellformen in den Kulturen relativ immer mehr ab und die S-förmigen und längeren Zellen zu, wobei die letzteren oft eine fadenartige Gestalt von beträchtlicher Länge zeigten. Während die kürzeren Zellformen keinen deutlichen Unterschied zwischen den Stämmen der Gruppe I und II erkennen ließen, waren die langen Zellgebilde bei den Stämmen der beiden Gruppen von unterschiedlicher Form. In den mehr als 48 Stunden alten Kulturen der meisten Stämme aus Gruppe II fanden sich viele sehr lange und feine, fadenartige Gebilde, die keine regelmäßigen Windungen besitzen und in ihrer schlanken Form mitunter an Vibrio bubulus (Gruppe III) erinnern. Bei den langen Zellformen, die in den Kulturen der Stämme aus Gruppe I auftraten, waren dagegen fast immer regelmäßige Windungen zu beobachten; auch waren diese Zellformen stets dicker als die langen Gebilde der Stämme aus Gruppe II.

In den Kulturen der katalase-negativen Vibrionen (Gruppe III: V. bubulus) waren fast stets nur sehr kurze, kommaförmige Zellen zu beobachten. Erst in über 48 Stunden alten Kulturen traten manchmal einige S-förmige Zellen in Erscheinung. Mitunter fanden sich bei einigen Stämmen dieser Gruppe auch einzelne längere, äußerst schlanke Zellgebilde ohne regelmäßige Windungen.

Die Beweglichkeit der Vibrionen nahm im allgemeinen in den ersten 48 bis 72 Stunden nach der Anzüchtung zu und blieb dann etwa 10 Tage lang mehr oder weniger gleichmäßig erhalten, um danach langsam zurückzugehen. Etwa 3 bis 4 Tage nach der Anzüchtung fanden sich in den Kulturen bereits mehrere unbewegliche Vibrionen, deren Zahl mit der Alterung der Kultur ständig größer wurde, während der Anteil der beweglichen Zellen entsprechend abnahm. Die kurzen Zellen führten außerordentlich schnelle und ruckartige Vor- und Rückwärtsbewegungen aus, die manchmal von nur sehr kurzen Pausen unterbrochen wurden.

Die Bewegungen der S-förmigen Zellen waren ähnlich, wenn auch etwas weniger lebhaft; mitunter zeigten diese Zellen, vor allem bei den Stämmen der Gruppe II, eine mehr schlängelnde Bewegung. Die längeren Zellformen bewegten sich ebenfalls mehr oder weniger ruckartig vor- und rückwärts, und zwar um so langsamer, je länger die Gebilde waren, die oft gleichzeitig um ihre Längsachse zu rotieren schienen.

Bei vergleichenden Beobachtungen wurde deutlich, daß die Beweglichkeit der katalase-negativen Vibrionen (Gruppe III: V. bubulus) größer als die der katalase-positiven Vibrionen (Gruppe I: V. fetus und Gruppe II: aerobe V.) war. Deutliche Unterschiede in der Beweglichkeit der Vibrionen der Gruppe gegenüber denen der Gruppe II ließen sich dagegen nicht fest stellen.

Die Zellen der beiden Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) erschienen dicker als die der Vibrionen der Gruppen I, II und III. Sie waren von kommaförmiger, S-förmiger und spiraliger Gestalt mit 3 - 6 Windungen. Längere Zellformen wurden in älteren Kulturen beobachtet. Die kommaförmigen Zellen bewegten sich sehr schnell und in ähnlicher Weise wie die Zellen der Vibrionen der Gruppen I und II. Die S-förmigen Zellen und mehr noch die längeren Zellformen, die mitunter aus einzelnen kommaförmigen Zellen zusammengesetzt zu sein schienen, bewegten sich zwar ebenfalls mehr oder weniger ruckartig vor- und rückwärts, doch zeigten sie dabei fast immer eine schlängelnde Bewegung.

b) Verhalten in halbfestem Nährmedium:

In halbfestem Bacto-Thiol-Medium mit 0,5 % Agar-Gehalt, in das die verschiedenen Stämme der Gruppen I, II und III durch seitlichen Stich entlang der Röhrchenwand verimpft worden waren, konnte das Wachstum der Vibrionen nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C (in normaler Atmosphäre) makroskopisch an einer im Bereich des Impfstiches liegen-

den weißlichen bis grauweißlichen, fahnenartigen Trübung des Nährmediums erkannt werden. Diese Trübungen waren in den Kulturen der katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I und II) mehr im oberen, in denen der katalase-negativen Stämme mehr im unteren Bereich des Impfstiches etwas deutlicher ausgeprägt. Nach 72stündiger Bebrütung der Kulturen erstreckten sich die inzwischen dichter gewordenen Trübungen vom Impfstich aus, wo sie am stärksten waren, etwa 2 - 3 mm tief in die Umgebung desselben.
Deutliche Unterschiede im Wachstum konnten hier zwischen den katalase-positiven Vibrionen-Stämmen der Gruppen I und II und den katalase-negativen Stämmen der Gruppe III nicht erkannt werden.

Die mit den Stämmen S 11 und S 40 angelegten Kulturen wiesen nach 12stündiger Bebrütung bereits schleierartige Trübungen im Bereich des Impfstiches und seiner Umgebung auf, die sich von unten nach oben rauchfahnenähnlich verbreiterten. Schon nach weiteren 24 Stunden war das Nährmedium in seinem ganzen oberen Teil getrübt.

Eine Membranbildung war auf der Nährbodenoberfläche bei keiner Kultur der verschiedenen Stämme der Gruppen I - IV zu beobachten.

Formen und Bewegung der Zellen der verschiedenen Stämme blieben bei der Kultivierung in dem halbfesten Nährmedium im wesentlichen stets gleich wie bei Kultivierung in flüssigem oder halbflüssigem Nährsubstrat.

c) Verhalten auf festen Nährmedien :

Die Prüfung des kulturellen Verhaltens auf festen Nährmedien erfolgte in der Weise, daß jeweils 1 Standard-Öse (3 mm ∅) einer frischen, gut gewachsenen Thiol-Kultur der einzelnen Vibrionen-Stämme auf Blutagar- und Schokoladeblutagar-Platten (beide Nährböden enthielten 10 %

defibriniertes Pferdeblut) sowie auf Brillantgrün-Blutagar-Platten (mit 10 % defibriniertem Hammelblut) ausgespatelt und 3 - 4 Tage sowohl in einer mit 10 - 15 % CO_2 angereicherten Atmosphäre bei leichtem Unterdruck als auch unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet wurden. Anschließend wurden die Kulturen makroskopisch und mit einer Lupe sowie gegebenenfalls mit dem Phasenkontrast-Mikroskop untersucht.

Zunächst seien die bei mikroaerophiler Züchtung gemachten Beobachtungen wiedergegeben.

Auf Blutagar wuchsen die katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) in Form kleiner, rotlaufartiger, gewöhnlich 1 - 2 mm großer, runder, leicht konvexer, meist scharf begrenzter Kolonien mit glatter, glänzender Oberfläche. Bei stereo-mikroskopischer Betrachtung ließen diese Kolonien eine ganz feine Granulierung erkennen, durch die sie ein bläulich-weißes oder metallisch-glänzendes Aussehen erhielten.

Die katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) bildeten gewöhnlich 2 - 3 mm große, runde, leicht konvexe, nicht immer scharf begrenzte Kolonien mit glatter, glänzender Oberfläche, die meist eine graugelbgrünliche bis hellockerfarbige Tönung aufwiesen. Gelegentlich konnte auch ein flächenhaftes Wachstum beobachtet werden.

Auf Schokoladeblutagar wuchsen sowohl die katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) als auch die katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) in Form kleiner, 1 - 2 mm großer, runder, leicht konvexer, scharf begrenzter Kolonien mit glatter, glänzender Oberfläche. Die Kolonien in den Kulturen der Stämme aus den Gruppen I und II waren transparent und tautropfenartig glasig, wohingegen die Kolonien in den Kulturen der Stämme aus Gruppe III leicht hellbräunlich getönt erschienen. Kam es zu einer Rasenbildung, so hatte dieser bei den katalase-positiven Vibrio

Kulturen ein grauglasiges, bei den katalase-negativen Vibrionen dagegen ein mehr grünlichglasiges Aussehen.

Auf Brillantgrün-Blutagar bildeten die katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) meist stecknadelkopfgroße, runde, leicht konvexe, scharf begrenzte, glatte, weißlich- bis bläulichgraue, glänzende Kolonien. Die Kolonien der katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) waren dagegen meist größer, undeutlich rund, oft unscharf begrenzt, leicht erhaben, glatt und von gelblichgrüner bis bräunlich-grüner Farbe; oft trat auch ein mehr flächenhaftes Wachstum der katalase-negativen Vibrionen von unregelmäßiger Form mit 1 - 2 cm Durchmesser und mehr auf.
Allgemein wurde beobachtet, daß die Vibrionen-Stämme der Gruppe I ein stärkeres Wachstum als die der Gruppe II hervorbrachten. Im Aussehen der Kolonien der Stämme dieser beiden Gruppen ergaben sich aber keine Unterschiede.
Auf den Blutagar- und Schokoladeblutagar-Platten kam es bei genügendem Feuchtigkeitsgehalt der Nährböden und reichlicher Beimpfung mit Kulturmaterial bei allen Stämmen(Gruppen I bis IV) zu einer Art Rasen- oder Schleierbildung.
Die Kolonien der katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) enthielten kurze kommaförmige, S-förmige und längere Zellformen mit 4 - 8 und manchmal mehr Windungen. Im übrigen neigten diese Stämme dazu, auf trockenen Nährböden vorwiegend kurze, auf feuchten Nährböden dagegen vorwiegend längere Zellformen zu bilden. In den Kolonien der katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III : V. bubulus) fanden sich überwiegend kurze Zellen, doch wurden bei diesen Stämmen auch häufig längere, sehr feine, wellige Zellgebilde beobachtet.

Die Beweglichkeit der Zellen der verschiedenen Vibrionen-Stämme war im wesentlichen gleich wie bei der Züch-

tung in flüssigem oder halbflüssigem Nährmedium, jedoch nicht so lebhaft. Sie hing von dem Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens ab; mit der Abnahme der Feuchtigkeit ging auch die Beweglichkeit entsprechend zurück.

Bei der aeroben Wachstumsprüfung wurden folgende Beobachtungen gemacht;
Die katalase-positiven Vibrionen-Stämme der Gruppe I (V. fetus) und die katalase-negativen Vibrionen-Stämme der Gruppe III (V. bubulus) ließen bei der Bebrütung der mit ihnen angelegten Kulturen unter normalen atmosphärischen Bedingungen auf festen Nährmedien in keinem Falle ein, auch nicht mikroskopisch (Phasenkontrast!) nachweisbares Wachstum erkennen.

Die katalase-positiven Vibrionen-Stämme der Gruppe II zeigten dagegen auf den mit ihnen angezüchteten und unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrüteten festen Nährmedien stets ein deutliches, wenn oft auch schwaches Wachstum. Die Kolonien glichen hierbei in ihrem Aussehen den bei mikroaerophiler Züchtung auftretenden und enthielten immer lebende Zellen.

Die beiden aus normalen (nichtabortierten) Feten isolierten Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) sind hier wegen ihres von dem Verhalten der Vibrionen-Stämme der Gruppen I, II und III völlig verschiedenen Verhaltens gesondert aufgeführt.

Beide Stämme wuchsen auf den mit ihnen beimpften festen Nährmedien bei der Bebrütung unter aeroben Bedingungen wie unter mikroarophilen Bedingungen gleich gut; es schien sogar, als würden sie in normaler Brutschrankatmosphäre besser gedeihen. Auf allen mit ihnen angezüchteten Nährmedien zeigten sie ein üppiges Wachstum (Blutagar, Schokoladeblutagar, Brillantgrün-Blutagar, Conradi-Drigalski-Agar, Endo-Agar, Kauffmann-Agar, einfacher Nähragar).

Auf Blutagar-Platten wuchsen beide Stämme in 2-6 mm großen, runden, erhabenen, konvexen, meist scharf abgesetzten, glänzenden, glatten Kolonien von weißlichgrauer bis hellgrauer Farbe. Beide Stämme verursachten eine ß-Hämolyse. Die auf Schokoladeblutagar und Brillantgrün-Blutagar auftretenden Kolonien glichen den eben beschriebenen, nur besaßen die Kolonien auf Schokoladeblutagar eine etwas ins bräunliche gehende Tönung.

Die beiden Stämme S 11 und S 40 zeigten in und auf allen Nährmedien, die mit ihnen angezüchtet worden waren, auch bei Zimmertemperatur (18 - 20°C) ein gutes Wachstum.

6. Biochemisches Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme.

Die biochemische Untersuchung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Vibrionen-Stämme sowie einer Zahl verschiedener Vibrionen-Laborstämme (siehe S. 172-175) erstreckte sich auf die Prüfung von Katalase-Aktivität, H_2S-Bildung, Nitrat-Reduktion, Urease-Aktivität, Gelatine-Verflüssigung und Toleranz gegenüber 3,5 % NaCl im Nährmedium (Bacto-Thiol-Medium).

Die verschiedenen Vibrionen-Stämme wurden vor ihrer Verimpfung in die einzelnen Testmedien jeweils nochmal in frisches Bacto-Thiol-Medium übertragen und 3 Tage bei 37°C unter normalen atmosphärischen Bedingungen bebrütet.
Vor und nach jedem Versuch erfolgte eine Prüfung der Kulturen auf Reinheit.

Katalase-Aktivität: Ein Teil der Vibrionen-Stämme, die auf festen Nährmedien nur im mikroaerophilen Milieu züchtbar waren, reagierte katalase-positiv ("Katalase-Zahl" kleiner als 5; der ermittelte Maximalwert betrug.

2. - Über die "Katalase-Zahl" siehe S. 142 - 144). Dementsprechend wurden die mikroaerophilen und katalase-positiven Vibrionen-Stämme in einer Gruppe (Gruppe I) und die mikroaerophilen und katalase-negativen Vibrionen-Stämme in einer anderen Gruppe (Gruppe III) zusammengefaßt.
Alle Vibrionen-Stämme, die auf festen Nährmedien sowohl unter mikroaerophilen als aber auch unter aeroben Bedingungen ein sichtbares Wachstum hervorbrachten, waren katalase-positiv (die ermittelten "Katalase-Werte" lagen zwischen 19 und 27). Diese aeroben und katalase-positiven Vibrionen-Stämme wurden in eine weitere Gruppe eingeordnet (Gruppe II). Die Stämme der Gruppe I waren aus dem Mageninhalt abortierter Feten, aus von Abortus-Fällen stammenden Sekundinen (Cotyledonen) und aus Präputial-Spülproben von Bullen durch direkte Anzüchtung des Untersuchungsmaterials isoliert worden. Die Stämme der Gruppe II sind aus abortierten Feten und/oder Sekundinen, aus normalen (nichtabortierten) Feten, aus Cervicalschleim von Kühen sowie aus Präputial-Spülproben von Bullen herausgezüchtet worden. Die Stämme der Gruppe III sind ausnahmslos aus Sperma und/oder Präputial-Spülproben von Bullen teils direkt (Station "B" und "C"), teils mit Hilfe des Anreicherungs-Verfahrens isoliert worden (Station "A").

Die beiden in ihrem kulturellen Verhalten von dem aller anderen Vibrionen-Stämme abweichenden Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) erwiesen sich als katalase-positiv.

H_2S-Bildung: die Prüfung auf die Bildung von Schwefelwasserstoff hatte bei allen Stämmen ein klares und eindeutiges Ergebnis, Alle katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) sowie die katalase-positiven Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) waren H_2S-negativ, d.h., sie vermochten keinen Schwefelwasserstoff zu produzieren.

Im Gegensatz dazu bildeten die katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) reichlich H_2S. Schon nach 24-stündiger Bebrütung dieser Stämme in einem modifizierten Kligler-Eisensulfat-Agar konnte eine beginnende oder schon deutlich ausgeprägte Schwarzfärbung des Testmediums beobachtet werden, die sich später verstärkte. Durch die Schwarzfärbung wurde die Bildung des Schwefelwasserstoffes angezeigt.

Nitrat-Reduktion: Mit Ausnahme der beiden Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) vermochten alle katalase-positiven (Gruppe I u. II) und ebenso alle katalase-negativen (Gruppe III) Vibrionen-Stämme Nitrat zu Nitrit zu reduzieren.

Urease-Aktivität: Eine deutliche Spaltung von Harnstoff innerhalb von 3-4 Tagen, erkennbar an einer intensiven Rotfärbung des Testmediums (nach Bader u. Hotz modifizierter Kligler-Agar), konnte nur bei den beiden Stämmen S 11 und S 40 (Gruppe IV) nachgewiesen werden.

Gelatine-Verflüssigung: Lediglich die beiden Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) verflüssigten Gelatine. Nach 3tägiger Bebrütung bei 37°C sowie nach 6tägiger Bebrütung bei 20°C war bei den beiden Stämmen sowohl in normaler Nährgelatine als auch in einer modifizierten Nährgelatine eine trichterförmige Verflüssigung zu beobachten.

Die katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I u. II) und die katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) wuchsen in keinem Fall in normaler Nährgelatine, wohl aber wenn auch meist nur schwach, in einer modifizierten Nährgelatine mit 0,1 % Agar-Gehalt, die jedoch von diesen Stämmen auch nach 3wöchiger Bebrütung nicht verflüssigt wurde.

Toleranz gegenüber 3,5% NaCl im Nährmedium: In Bacto-Thiol-Medium, dessen NaCl-Gehalt auf 3,5% erhöht worden war, konnte nach 3-4tägiger Bebrütung ein sichtbares Wachstum nur bei den katalase-negativen Vibrionen-Stämmen (Gruppe III) sowie bei den aerob wachsenden, katalase-positiven Vibrionen-Stämmen (Gruppe II) und den Stämmen S 11

und S 40 (Gruppe IV) beobachtet werden. Die Mikroaerophilen katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe I) ließen dagegen nie ein Wachstum in diesem Medium erkennen, auch nicht nach verlängerter Bebrütung.
Die beiden Stämme S 11 und S 40 (Gruppe IV) wurden wegen ihres besonderen Verhaltens bei allen Untersuchungen noch auf Conradi-Drigalski-Agar, Endo-Agar und Kauffmann-Agar verimpft und 24 Stunden im normalen Brutschrank bebrütet. Auf den Drigalski- und Endo-Platten war ein intensiver Farbumschlag der Nährböden nach Rot sichtbar, wohingegen die Kauffmann-Platten keinen deutlichen Farbumschlag aufwiesen.

7. Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme gegenüber dem Cervico-Vaginalschleim vibrio-fetus-infizierter Rinder im Röhrchen-Agglutinations-Test.

Mit Hilfe des Röhrchen-Agglutinations-Tests wurde auch das serologische Verhalten der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Vibrionen-Stämme sowie verschiedener Vibrionen-Laborstämme (siehe S. 172 - 175) gegenüber eindeutig vibrio-fetus-positivem Cervical- und Vaginalschleim untersucht.

Ein positiver Ausfall der Agglutinations-Reaktion konnte nur bei den mikroaerophilen katalase-positiven Vibrionen-Stämmen (Gruppe I) beobachtet werden. In diesen Fällen traten die positiven Reaktionen, die stets in allen angesetzten Verdünnungen (siehe S. 148/149) vorkamen, meist schon nach 24 Stunden, auf. Es handelt sich um OH-Agglutinationen, bei denen die H-Komponente stets deutlicher als die O-Komponente ausgeprägt war. Die Untersuchungen wurden mit mehreren, von verschiedenen Rindern stammenden Schleimproben vorgenommen, wobei immer wieder die gleichen

Beobachtungen gemacht werden konnten, nämlich, daß die einzelnen Stämme mit den verschiedenen Schleimproben im wesentlichen immer etwa gleich stark agglutinierten. Zwischen den einzelnen Stämmen ergaben sich insofern Unterschiede, als manche Stämme stets stärker reagierten als die übrigen. Der empfindlichste Stamm war der von Terpstra in Holland aus Abortus-Material isolierte Stamm 241.
Die aeroben katalase-positiven Vibrionen-Stämme (Gruppe II) reagierten gegenüber den eindeutig vibrio-fetus-positiven Vaginal-Schleimproben agglutinatorisch stets negativ. Die mit Antigen von den katalase-negativen Vibrionen-Stämme (Gruppe III) angesetzten Agglutinations-Versuche hatten erwartungsgemäß ebenfalls negative Resultate. Auf die serologische Untersuchung der beiden Stämme S 11 und S 40 ist verzichtet worden.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Grögel hat in seinen Untersuchungen festgestellt, daß in Abortusmaterial vom Rind (Plazenten, Feten) vielfach katalase-positive und H_2S-negative Vibrionenstämme durch Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens nachweisbar waren. Der Zeitpunkt des Verwerfens- Früh- oder Spätstadium - spielte hierbei keine Rolle. Auffallend war ferner, daß ebenso häufig Vibrionen derselben Art vorkamen, wenn in dem Material gleichzeitig spezifische Verwerfenserreger des Rindes, wie Brucellen, Schimmelpilze usw. als eindeutige Ursache des Abortes vorlagen. Dieselben Keime konnten auch in den unveränderten Eihäuten von Normalgeburten in ca. 48 % festgestellt werden. Die Frage der Bedeutung dieser Vibrionenstämme wurde von Grögel offengelassen. Jedenfalls waren auf Grund dieser Ergebnisse Zweifel an einer ursächlichen Bedeutung berechtigt. Durch eigene Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, welche Organe sich bei verworfenen Feten am besten zum Nachweis von Vibrionen eignen. Zu diesem Zweck wurden

möglichst alle Organe verworfener Früchte und, soweit vorhanden, auch die zugehörigen Nachgeburten in halbfesten Thiolröhrchen angezüchtet. Insgesamt konnten in 58 % der untersuchten Fälle Vibrionen ermittelt werden. Fast regelmäßig waren die Vibrionen im Mageninhalt nachweisbar. In der Häufigkeit des Vorkommens folgen dann Darminhalt, Gehirn, Nieren, Leber, Herz, Lunge und Milz. Die Untersuchung des Mageninhaltes verworfener Früchte allein genügt demnach zum Nachweis von Vibrionen. Dies gilt bekanntlich auch für die übrigen Verwerfenserreger des Rindes und ist darauf zurückzuführen, daß die Infektion des Foetus in erster Linie durch Abschlucken von Fruchtwasser erfolgt, das die Erreger enthält.
Unter Benützung des gleichen Verfahrens wurden ferner das Fruchtwasser und die Früchte von 50 geschlachteten, trächtigen Kühen untersucht, die keinerlei Veränderungen aufwiesen. Auch hier konnten in insgesamt 20 Fällen Vibrionen oder vibrionen-ähnliche Keime gezüchtet werden, die vorwiegend im Fruchtwasser vorkamen. Die Frage, ob es sich dabei um eine intrauterine Besiedlung oder nachträgliche Verunreinigung handelte, ist in diesem Rahmen ohne Bedeutung. Wichtig ist hier die Tatsache, daß der Nachweis solcher Keime selbst bei möglichst keimfreier Bearbeitung von Material möglich ist, das nicht von Verwerfensfällen stammt.

In weiteren Versuchen wurden Vorhautspül- und Samenproben von Bullen mehrerer Besamungsstationen auf das Vorkommen von Vibrionen untersucht. Einerseits wurde dabei vergleichsweise das Vorkommen von Vibrionen in den Spül- und Samenproben der gleichen Bullen, andererseits die Möglichkeit des Nachweises derselben durch unterschiedliche Verarbeitung und Kultivierung geprüft. Die Ergebnisse sind nicht eindeutig. Bei den Bullen einer Station gelang der Nachweis von Vibrionen durch die Untersuchung der Samenproben, die der Anstalt zugesandt und

deshalb erst ein oder mehrere Tage nach der Entnahme gezüchtet wurden, dreimal so häufig wie durch Untersuchungen der Spülproben.

Im Gegensatz zu dieser Feststellung konnten bei den Bullen einer anderen Station in den Präputialspülproben von 14 Bullen Vibrionen nachgewiesen werden, nicht in einem Falle dagegen in den Samenproben, die allerdings unmittelbar nach der Entnahme angezüchtet wurden. Eine ähnliche Beobachtung hat bereits GÖTZ (48) bei seinen Untersuchungen beschrieben. Sie läßt sich nur dadurch erklären, daß die unmittelbar nach der Entnahme in geringer Menge in den Ejakulaten vorhandenen Vibrionen bei der Kultur nicht erfaßt werden, während des Transportes aber eine wesentliche Vermehrung stattfindet.

Unter günstigen Voraussetzungen, besonders bei Fehlen von Bakt. proteus und Pseudomonas aeruginosa ist in den Spülproben der Nachweis von Vibrionen durch direkte Kultur unter Verwendung verschiedener Nährmedien gleich häufig möglich wie durch Anreicherung in Thiolmedium. Für die direkte Kultivierung scheinen sich nach den vorliegenden Ergebnissen brillant-grünhaltige Agarplatten mit verschiedenen weiteren Zusätzen am besten zu eignen. Es hat sich gezeigt, daß nach Zentrifugieren der Spülflüssigkeit die kulturelle Verarbeitung des Bodensatzes und der überstehenden Flüssigkeit fast gleiche Ergebnisse bringt.

Die Differenzierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus abortierten Rinder-Feten und Sekundinen, normalen (nichtabortierten) Rinder-Feten und Präputial-Spülproben bzw. Sperma von Bullen isolierten Vibrionen-Stämme und der gleichzeitig untersuchten Vibrionen-Laborstämme wurde auf Grund des kulturellen, biochemischen und serologischen Verhaltens von 90 untersuchten Stämmen vorgenommen.
Aus der nachstehenden Tabelle X, in der alle Unterschiede

die sich bei den Untersuchungen ergaben, nebeneinander aufgeführt sind, ist ersichtlich, daß die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Vibrionen-Stämme einschl. der geprüften Vibrionen-Laborstämme 3 verschiedenen Vibrionen-Typen zuzurechnen sind.

Tabelle X: Differenzierung der isolierten Vibrionen-Stämme.

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
Morphologie	kurze und lange Zell-Formen	kurze und lange Zell-Formen	fast nur kurze, feine Zell-Formen
Wachstum auf Blutagar	bläulichweiß oder metallisch glänzend	bläulichweiß oder metallisch glänzend	graugelb-grü lich oder ockerfarben
mikroaerophiles W.	+	+	+
Aerobes Wachstum	-	+	-
Tiefenwachstum in Bacto-Thiol-Medium	-	-	+
Wachstum in Bacto-Thiol-Medium mit 3,5% NaCl-Gehalt o)	- (-)	+ (+)	+ (+)
Katalase-Aktivität	+	+	-
H_2S-Bildung	-	-	+
Nitrat-Reduktion	+	+	+
Urease-Aktivität	-	-	-

o) Wachstum zur Zeit der Isolierung aus dem Untersuchungsmaterial und 6 Monate später (in Klammern).

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
Gelatine-Verflüss.	-	-	-
Hämolyse	-	-	-
Agglutination mit vibrio-fetus-pos. Vaginalschleim	+	-	-

Die Vibrionen-Stämme der Gruppe I sind aus Abortus-Material (fetaler Mageninhalt und/oder Secundinae) sowie aus Präputial-Spülproben und/oder Sperma von Bullen durch direkte Züchtung, die Vibrionen-Stämme der Gruppe II aus Abortus-Material (Feten und/oder Secundinae), normalen (nichtabortierten) Feten, Cervicalschleim von Kühen sowie Präputial-Spülproben, die Vibrionen-Stämme der Gruppe III ausnahmslos aus Präputial-Spülproben und/oder Sperma von Bullen teils durch direkte Züchtung, teils mit Hilfe des Anreicherungs-Verfahrens isoliert worden.

Die Stämme der Gruppe IV S 11 u. S 40) sind mit Hilfe des kulturellen Anreicherungs-Verfahrens aus normalen Feten gezüchtet worden. Beide Stämme wuchsen auf allen gebräuchlichen Nährmedien bei 37°C und 20°C sowohl unter mikroaerophilen als auch unter aeroben Bedingungen sehr üppig und verursachten auf Blutagar-Platten Hämolyse. Sie waren katalase-positiv und H_2S-negativ, verflüssigten Gelatine, spalteten Harnstoff und griffen Zucker an; Nitrat wurde von ihnen nicht reduziert.

Auf Grund der morphologischen, kulturellen, biochemischen und serologischen Untersuchungsergebnisse

sowie epidemiologischer Erhebungen werden

die Vibrionen der Gruppe I	als Vibrio fetus (pathogen),
die Vibrionen der Gruppe II	als apathogener (oder allenfalls fakultativ pathogener) aerober Vibrionen-Typ,
die Vibrionen der Gruppe III	als Vibrio bubulus (apathogen)

angesprochen.

Bei den Stämmen der Gruppe IV (S 11 u. S 40) dürfte es sich um saprophytäre Spirillen handeln. Eine exakte Differenzierung der beiden Stämme wurde nicht vorgenommen.
Auf Grund der biochemischen und serologischen Differenzierung vorstehender Stämme lassen sich in Zusammenhang mit den übrigen Angaben über Herkunft und Art der Züchtung folgende Schlüsse ableiten:

Durch die Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens zum Nachweis von Vibrio fetus in abortierten Feten, Nachgeburten von Verwerfensfällen, Cervixschleimproben von weiblichen Tieren und Präputialspülproben von Bullen werden sehr häufig Vibrionen in den Ausgangskulturen nachgewiesen. Diese Keime sind auch in den Plazenten von Normalgeburten und in unveränderten Feten geschlachteter trächtiger Kühe zu finden und also scheinbar ubiquitär. Durch die mikroskopische Untersuchung von Material aus den Ausgangsröhrchen ist die Unterscheidung nicht möglich, welche Vibrionenart vorliegt. Die Reinkultur der Vibrionen aus den Ausgangsröhrchen gelingt nur in seltenen Fällen, da die verschiedensten Begleitkeime darin genau so gut wachsen. Bei Überzüchtung auf feste Nährmedien werden die Platten und die langsam wachsenden Vibrionen von den schnell wachsenden Begleitkeimen vielfach restlos überwuchert.

Der Untersucher steht in diesen Fällen vor der Frage, wie

er solche Befunde diagnostisch verwerten soll. Kostspielige, ergänzende Probeentnahmen und Untersuchungen sind die Folge; die Entscheidung, ob veterinärpolizeiliche Maßnahmen anzuordnen, Bullen auf Stationen von der Samengewinnung auszuschließen sind, und sonstige Probleme ergeben sich in solchen Fällen.

Die genaue Differenzierung der reingezüchteten Vibrionen-Stämme hat gezeigt, daß durch die Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens in die Probenuntersuchung fast ausschließlich aerobe Vibrionen oder Vibrio bubulus-Stämme ermittelt werden. Der Nachweis dieser Keime ist aber bedeutungslos, da sie ubiquitär und apathogen sind. Irgendwelche Vorteile zum Nachweis von Vibrio fetus hat dieses Verfahren nicht erbracht. Nur in einem einzigen Falle wurde auf diese Weise ein Vibrio-fetus-Stamm isoliert (542). Bereits mikroskopisch waren aber in diesem Fetus die Vibrionen als Verwerfensursache nachzuweisen.

Selbst bei Reinzüchtung der aeroben Vibrionenarten können sich noch diagnostische Irrtümer ergeben, sofern lediglich die Katalaseaktivität und die H_2S-Bildung als einzige Kriterien für die Unterscheidung von Vibrio fetus und sonstigen Vibrionenarten berücksichtigt werden. Die Unterscheidung von Vibrio fetus und aeroben Vibrionenarten ist leicht möglich, nur muß das Vorkommen der letzteren überhaupt in Betracht gezogen und eine genaue Differenzierung der Reinkulturen vorgenommen werden.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird die Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens zum Nachweis von Vibrio fetus für unnötig erachtet, weil die Diagnose dadurch erschwert wird.

Zusammenfassung

1. Durch Einbringen von Untersuchungsmaterial in halbfestes Thiolmedium wird in sehr vielen Fällen ein Wachstum von Vibrionen erreicht. Bei abortierten Feten konnten dadurch in unterschiedlicher Häufigkeit Vibrionen in allen Organen, am häufigsten im Mageninhalt festgestellt werden. Auch im Fruchtwasser und in Früchten geschlachteter Kühe, die keine Veränderungen im trächtigen Uterus aufwiesen, gelang in 40 % der Nachweis von Vibrionen.

2. In Präputialspül- und Samenproben konnte durch Anreicherung sehr häufig Vibrio bubulus gezüchtet werden. Bei bakteriell weniger verunreinigten Spülproben gelingt die direkte Kultur dieser Keime auf festen Nährböden in gleicher Häufigkeit. Frisch entnommene Samenproben scheinen sich nicht zum Nachweis von (apathogenen) Vibrionen zu eignen, sehr gut dagegen Samenproben 1 - 2 Tage nach der Entnahme.

3. Die Einschaltung eines Anreicherungsverfahrens zur Feststellung von Vibrio fetus im Untersuchungsmaterial wird als unnötig und die Diagnose erschwerend erachtet. Mikroskopisch ist die Unterscheidung der Vibrionen in den Anreicherungsröhrchen nicht möglich; die Reinkultur derselben gelingt wegen Überwucherung durch Begleitkeime selten.

Mit Hilfe der Anreicherung konnten auf Grund der Untersuchung von Reinkulturen nur aerobe Vibrionen und Vibrio bubulus nachgewiesen werden.

4. An Hand der biochemischen und serologischen Prüfung von 90 Vibrionenstämmen wird ein Schema zur Differenzierung von Vibrionen aufgestellt, die im

Rahmen vorstehender Versuche gezüchtet wurden, ferner als Laborstämme an der Anstalt vorhanden waren.

V. LITERATUR.

1. Adler, H.C.

Diagnose of Vibrio Fetus Carrier Bulls by Intravaginal Inoculation of Guinea Pigs.
Nord. Vet. Med., 5 (1953) : 454 - 458.

2. Adler, H.C.

Methode für die Diagnose der Vibrio-fetus-Infektion beim weiblichen Rind.

Bericht FAO-Tagung, Kopenhagen 1954 (152).

3. Adler, H.C., B.E. Albertsen, N.O. Rasbech u. L. Szabo
Diagnosticering af Vibrio fetus-Infektionen hos tyre ved smittelforsog.
Nord. Vet. Med., 4 (1952) : 462 - 470.

4. Adler, H.C., B.E. Albertsen u. L. Szabo

Forsatte undersogelser over Vibrio fetus som arsag til ufrugtbarhed hos kvaeg.

Statens Husdyrbrugs, Kopenhagen 1954.

5. Akkermans, J.P., J.I. Terpstra u. H.G. Van Waveren

Over de betekenis van verschillende vibrionen voor de steriliteit van het rund.
Tijdschr. Diergeneesk., 81 (1956) : 430 - 435.

6. Anon, -

FAO-Tagung, Kopenhagen 1954
zit. nach Dedié u. Voigt (25).

7. Baier, W. u. H. Taxacher

Auftreten von Vibrio-fetus-Infektion.
Bayer. Tierärzteblatt, 3 (1952) : 61.

8. Beer, J.

Vibrio-fetus-Funde in Sachsen-Anhalt.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 68 (1955) : 10 - 12.

9. Berthelon, M. u. J. Tournut

Vibriose bovine.
Rev. Méd. Vét., 105 (1954) : 709, 106 (1955) : 1 u. 111.

10. Binns, W.

An Electron Micrograph of Vibrio Fetus.
Cornell Vet., 43 (1953) : 559 - 561.

11. Binns, W. u. M.G. Fincher

Vibriosis in Cattle.
Cornell Vet., 44 (1954) : 512 - 530.

12. Boyd, H. u. N. Lagerlöf

Vibriose bovine en Suède.
Bull. Off. Int. Epizoot., 42 (1954) : 649 - 670.

13. Breed, R.S., E.G.D. Murray u. A.P. Hitchens

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
6th Ed., The Williams & Wilkins Co. Baltimore,
Md., 1948.

14. Brodauf, H.

Über eine neue Geräteausstellung zur Sekretentnahme
aus dem Präputialschlauch des Bullen und der Portio

vaginalis uteri des Rindes.
Mhefte Vet. Med., 9 (1954) : 485.

15. Brodauf, H.

Eine neue Methode zur Gewinnung von Präputial- und Cervicalsekret.
Tierärztl. Umschau, 9 (1954) : 347 - 348.

16. Brodauf, H.

Gewinnung von Präputialsekret des Bullen durch die Saugmethode.
Dtsch. tierärztl. Wschr., 62 (1955); Fortpflzg., Zuchthyg. u. Haustier-Bes., 5 (1955) : 92 - 93.

17. Brodauf, H.

Beobachtung zum klinischen Bild der Vibriosis.
Mhefte Vet. Med., 10 (1955) : 208 - 210.

18. Bryner, J. H. u. A. H. Frank

A Preliminary Report on the Identification of Vibrio Fetus.
Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 76 - 78.

19. Bryner, J. H. u. A. H. Frank

Laboratory Techniques for Isolation and Propagation of Vibrio Fetus from Cattle.
Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 634 - 635.

20. Chevé, J. u. J. Gauthier

Étude biochimique de souches de "V. foetus" d'origine bovine.
Bull. Acad. Vét., 29 (1956) : 115 - 119.

21. Czarnowski, A.

Przypadi wibriozy bydla i owiec na terinie województwa gdańskiego.
Med. Wet., 12 (1956) : 641 - 645.

22. Deas, D. W.

Factors influencing herd fertility in cattle.
Vet. Rec., 62 (1950) : 663 - 665.

23. Dedié, K.

Zur selektiven Züchtung von Vibrio fetus.

Bericht des 2. Kongr. der Deutschen Veterinärmed. Gesellschaft, Bad Nauheim 1957 : 86 - 88.

24. Dedié, K.

Unsere gegenwärtige Lehrmeinung zur Vibriosis genitalis beim Rind.
Mhefte Vet. Med., 12 (1957) : 49 - 52.

25. Dedié, K. u. A. Voigt

Die Vibriosis genitalis in Mitteldeutschland.
Mhefte Vet. Med. 10 (1955) : 463 - 468.

26. DIFCO MANUAL

of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 9th Ed, Difco Laboratories Inc., Detroit, Mich., USA

27. Dobbs, E.M. u. R.W. McIntyre

A Case Report of Vibrionic Abortion in a Goat Herd.
Calif. Vet., 4 (1951) : 19.

28. Doyle, -

Am. J. Vet. Res., 9 (1944) : 3.
zit. nach G. Zintz (184).

29. Easterbrooks, H. L. u. W. N. Plastridge

Experimental Transmission of Vibrio Fetus and by Contact.
J. Am. Vet. Med. Ass., 120 (1952) : 199 - 201.

30. Easterbrooks, H. L. u. W. N. Plastridge

Vibriosis : Its Pathogenesis and Management.
Vet. Med., 48 (1953) : 63 - 64.

31. Easterbrooks, H. L., W. N. Plastridge, L. F. Williams u. E. M. Kiggins

Vibriosis: Diagnostic and Therapeutic Considerations.
Vet. Med., 50 (1955) : 51 - 56 u. 68.

32. Ehrlich, J.

Beitrag zur klin. Diagnose und Therapie der Vibrio fetus-Infection beim Rinde.
Tierärztl. Umschau, 10 (1955) : 421 - 427.

33. Firehammer, B. D. u. H. Marsh

Preparation of Antigen for Detection of Agglutinins for Vibrio Fetus.
Am. J. Vet. Res., 14 (1953) : 392 - 395.

34. Flatla, J. L., M. Braend u. A. Sudboe

Some Observations on Vibrio Foetus Infection in Cattle.
Rep. 2nd Int. Congr. Physiol. Anim. Reprod., Copenhagen 1952, 3 : 140 - 148.

35. Florent, A.

Isolement d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache (Vibrio bubulus).

C. R. Soc. Biol., 147 (1953) : 2066 - 2069.

36. Florent, A.

Bericht FAO-Tagung, Kopenhagen 1954 (152).

37. Florent, A.

zit. nach M. Vandeplassche (163).

38. Florent, A.

Méthode d'isolement de Vibrio foetus à partir d'échantillons polymicrobiens, spécialement du liquide préputial. Milieu sélectif "coeur-sang-gelose au vert brillant" en microaérobiose.

C. R. Soc. Biol., 150 (1956) : 1059 - 1063, ergänzt durch persönliche Mitteilung 1957.

39. Florent, A. u. M. Vandeplassche

Valeur comparée de la génisse d'épreuve et de la culture sur milieu sélectif du liquide préputial, pour la confirmation de l'infection a vibrio fetus du taureau.
Rep. 3rd Int. Congr. on Animal Reproduction, Cambridge 1956, Pathology, Section II: 15 - 17.

40. Frank, A. H.

Kultur Methode für Vibrio-Bakterien.
Bericht FAO-Tagung, Kopenhagen 1954 (152).

41. Frank, A.H. u. J.H. Bryner

An Instrument for Collecting Samples from the Reproductive Tract of Cows for Bacteriological Study.

J. Am. Vet. Med. Ass., 121 (1952) : 97 - 98.

42. Frank, A.H. u. J.H. Bryner

Observations on Vibriosis of Cattle in Relation to Impaired Fertility.
Proc. U.S. Livestock San. Ass. 1953: 165 - 175.

43. Fras, A., M. Karlović u. P. Grmovšek

Vibrio foetus kod goveda u Jugoslaviji.
Vet. Arh. Zagreb, 26 (1956) : 174 - 177.

44. Garm, O., H. Hoff u. O. Skjerven

Kurative behandlingsforsok av vibriose.
Nord. Vet. Med., 5 (1953) : 401 - 416.

45. Gauthier, J. u. J. Chevé

Étude de l'abortement vibrionien dans l'espèce bovine, isolement des souches de Vibrio foetus.
Rec. Méd. Vét., 81 (1955) : 555 - 563.

46. Gminder, A.

Nachweis von Spirillen als Ursache des ansteckenden Verkalbens auch in Deutschland.
Berl. tierärztl. Wschr., 38 (1920) : 184 - 185.

47. Goerttler, V.

Probleme der Vibriosis-Infektion und der Vibriosisforschung.
Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 99 - 101.

48. Götz, L. M.

Bakteriologische Untersuchungen über das Vorkommen von Vibrionen in den Geschlechtsorganen weiblicher und männlicher Rinder.
Vet. Dess. München 1956.

49. Grimm, W.

Spirillen als Ursache des seuchenhaften Abortus in einer Schafherde.

Tierärztl. Rundschau, 33 (1927) : 39 - 43.

50. Grögel, K. F.

Das Vorkommen und der bakteriologische Nachweis von Vibrionen beim weiblichen Rinde.

Vet. Diss. München 1957.

51. Hansen, P. A., K. E. Price u. M. F. Clements

Suitable Thioglycolate Media for the Cultivation of Vibrio Fetus.
J. Bact., 64 (1952) : 772.

52. Harms, F. u. R. Hörter

Die Züchtung von Vibrio fetus und Vibrio suis.
Dtsch. tierärztl. Wschr., 60 (1953) : 320 - 322.

53. Herzberg, M. u. M. Ristic

Colonial Variants of Vibrio Fetus.
Proc. Soc. Am. Bact., May 8 - 12, 1955 : 55.

54. Hignett, P. G.

Vibrio foetus Infection in Cattle.
Vet. Rec., 63 (1951) : 268 - 269.

55. Hignett, S. L.

Factors Influencing Herd Fertility.
Vet. Rec., 62 (1950) : 652 - 663.

56. Hoff, H.

Todningsforsok med to ovine Vibrio fetus stammer pa drektige marsvin og virginelle kviger.

Nord. Vet. Med., 5 (1953) : 761 - 768.

57. Hoppe, F.

Et fammensat antibioticums anveldelse over for klinisk normale koers regelmaessige omlobning i et delvis med Vibrio fetus inficeret milieu.

Nord. Vet. Med., 7 (1955) : 141 - 150.

58. Hubrig, Th.

Zur bakteriologischen Diagnostik von Vibrio fetus.

Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 271 - 276.

59. Hubrig, Th. u. E. Röhr

Das charakteristische Wachstum von Vibrio fetus (des Rindes) auf Blutagar.
Zbl. Bakt. I Orig., 167 (1956) : 233 - 237.

60. Hubrig, Th. u. K. Wohanka

Serologische und biochemische Untersuchungen an Vibrionen.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 69 (1956) : 4 - 7.

61. Hubrig, Th. u. K. Wohanka

Vibrio fetus. Klinische Schlußfolgerungen auf Grund

biochemischer und serologischer Untersuchungen.
Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 452 - 455.

62. Hubrig, Th., K. Wohanka u. G. Gränz

Zur Frage der Erkennung Vibrio fetus-infizierter Deck- und Besamungsbullen.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 69 (1956) : 479-483.

63. Huddleson, I. F. u. I. Forrest

A Satisfactory Medium for the Isolation, Cultivation, and Maintenance of Viability of Vibrio fetus (Bovine).
J. Bact., 56 (1948) : 508.

64. Hughes, D. E.

A Study of the Diagnosis of Bovine Vibriosis with Special Reference to the Detection of Agglutinins in the Vaginal Secretions.
Cornell Vet., 43 (1953) : 431 - 444.

65. Hughes, D. E.

Sammeln von Cervical-Schleim nach der Tampon-Methode.
Bericht FAO-Tagung, Kopenhagen 1954 (152).

66. Hughes, D. E.

Notes on Vibriosis with Special Reference to the Isolation of Vibrio Fetus from Semen and Preputial Fluids.
Cornell Vet., 46 (1956) : 249 - 256.

67. Hughes, D. E. u. H. L. Gilman

A Satisfactory Method for the Culture of Vibrio Fetus.

Cornell Vet., 43 (1953) : 463.

68. Huntoon, F. M.

"Hormone" Medium. A Simple Medium Employable as a Substitute for Serum Medium.

J. Infect. Dis., 23 (1918) : 169 - 172.

69. Iwata, A., H. Kawashima u. Y. Suzuki

Studies on Vibriosis in Cattle. III. Experimental Studies on the Laboratory Animals.

Exp. Rep. Govt. Exp. Sta. Anim. Hyg. Japan, No. 29 (1953) : 237 - 259; ref. Vet. Bull., 26 (1956) : 194.

70. Jacotot, H., J. Gallut u. A. Vallée

Quelques données sur l'infection du bétail français par "Vibrio foetus".
Bull. Acad. Vét., 27 (1954) : 153 - 158.

71. Jacotot, H. u. A. Vallée

Nouvelles données sur l'infection du bétail français par "Vibrio foetus".
Bull. Acad. Vét., 29 (1956) : 121 - 126.

72. Jansen, J. u. H. Kunst

Het ei als voedingsbodem voor Vibrio foetus.

Tijdschr. Diergeneesk., 76 (1951) : 178.

73. Jones, F. S., M. Orcutt u. R. B. Little

Vibrios Associated with Intestinal Disorders of Cows and Calves.

J. Exper. Med., 53 (1931) : 853 - 863.

74. Kawashima, H., A. Iwata u. Y. Suzuki

Studies on Vibriosis of Cattle. I. Vibrionic Abortion in Cattle and Enzootic Infertility.

Exp. Rep. Govt. Exp. Sta. Anim. Hyg. Japan, No. 29 (1953) : 211 - 225; ref. Vet. Bull., 26 (1956) : 194.

75. Kawashima, H., A. Iwata u. Y. Suzuki

Vibrio Fetus Infection in Japan.
Bull. Off. Int. Epizoot., 42 (1954) : 621 - 640.

76. Koslak, A.

Wyniki nowzych badań nad wibrioza bydla.
Med. Wet., 12 (1956): 148 - 151.

77. Kuzdas, C.D. u. E.V. Morse

Physiological Characteristics Differentiating Vibrio Fetus and Other Vibrios.

Am. J. Vet. Res., 17 (1956) : 331 - 336.

78. Laing, J.A.

Vibrio Fetus Infection of Cattle.

Food and Agricultural Organisation of the UN, Rome, FAO Agricultural Studies, No. 32 (1956).

79. Lawson, J.R. u. D.J. McKinnon

Vibrio Foetus Infection in Cattle.

70th Ann. Congr. Brit. Vet. Ass., Sept. 7 - 13, 1952 : 1 -10; Vet. Rec., 64 (1952) : 763 - 777.

80. Lawson, J.R. u. D.J. McKinnon

Experimental Transmission of Vibrio Fetus.

Proc. 15th Int. Vet. Congr. 1953, Stockholm, V: 182 u. 821.

81. Lawson, J. R. u. D. J. McKinnon

Kulturdiagnose des Vibrio fetus bei verdächtigen Feten und Vagina-Schleimen.

Bericht FAO-Tagung 1954 (152).

82. Leidl, W. u. A. Mahrla

Das Verhalten von Trichomonas foetus und Vibrio foetus bei der Tiefkühlung.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 61 (1954); Fortpflzg., Zuchthyg. u. Haustier-Bes., 4 (1954) : 101 - 102.

83. Lerche, M.

Spirillen als Ursache des ansteckenden Verkalbens. Dtsch. tierärztl. Wschr., 30 (1920) : 281 - 282.

84. Lerche, M.

Beitrag zum Spirillenabortus beim Rinde.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 35 (1927) : 484 - 487.

85. Levi, M. L., L. Neemann, H. Kerstein u. R. Tamarin

Proc. 15 th Int. Vet. Congr. 1953, Stockholm, I: 112.

86. Lindenstruth, R. W. u. B. Q. Ward

Viability of Vibrio Fetus in Hay, Soil and Manure. J. Am. Vet. Med. Ass., 113 (1948) : 163.

87. Lindquist, K.

The Occurence of Vibrio Strains Other Than Vibrio

Fetus In the Genital Organs of Cattle.

Nord. Vet. Med., 7 (1955) : 826 - 832.

88. Marbach

Ätiologie der Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind.

Mhefte Vet. Med., 10 (1955) : 197 - 201.

89. McFadvean, J. u. S. Stockman

Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Inquire into Epizootic Abortion, Eyre and Spottiswoode Ltd., London;
Part I : Epizootic Abortion in Cattle, London 1909,
Part II: Abortion in Sheep, London 1913,
Part III: Final Report of the Committee..., London 1913.

90. Merkt, H. u. C. Sánchez-Garnica

Gewinnung des Vorhautsekretes beim Bullen zur mikrobiellen Untersuchung (Präputialspülprobe).

Dtsch. tierärztl. Wschr., 59 (1952); Fortpflzg. u. Bes. d. Haustiere, 2 (1952) : 3 - 5.

91. Merkt, H. u. C. Sánchez-Garnica

Die Entnahme einer Cervixtupferprobe zur mikrobiellen Untersuchung beim Rinde.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 59 (1952); Fortpflzg. u. Bes. d. Haustiere, 2 (1952) : 10 - 12.

92. Mitscherlich, E. u. E. Forschner

Untersuchungen über die Vibrio fetus-Infektion des Rindes.
Mhefte prakt. Tierheilk., 8 (1956) : 135 - 147.

93. Moore, G. R.

Clinical Aspects of Vibrio Fetus Infection in Cattle.

J. Am. Vet. Med. Ass., 116 (1950) : 190 - 192.

94. Morgan, W. J. B.

The Diagnosis of Vibriosis in Bulls.

Rep. 3d Int. Congr. on Animal Reproduction, Cambridge 1956, Pathology, Section II : 20 - 23.

95. Morgan, W. J. B.

A Note on the Isolation and Identification of Vibrio fetus from Cattle.
Vet. Rec., 69 (1957) : 32 - 33.

96. Morse, E. V. u. M. Ristic

Experimental Vibrio Fetus Infection in Guinea Pigs; III. Pathogenicity Studies and the Effect of Guinea Pig Passage upon Agglutinogens.

Am. J. Vet. Res., 15 (1954) : 599 - 603.

97. Mundt, W.

Der Nachweis von Vibrio fetus an verschiedenen Stellen des infizierten männlichen und weiblichen Genitalapparates des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der histopathologischen Situation des weiblichen Geschlechtstraktes.
Der prakt. Tierarzt 1955: 294 - 298.

98. Mundt, W.

Untersuchungen über Tierpathogenität von Vibrio foetus und Spirillum suis aus dem Schweinedarm an Meerschweinchen und Kaninchen.

Der prakt. Tierarzt 1956: 89 - 92.

99. Mundt, W.

Bewegungsstudien an Vibrio foetus im Hinblick auf den zeitlichen Infektionsverlauf.

Der prakt. Tierarzt 1957: 321 - 322.

100. Mundt, W.

Die Züchtung von Vibrio foetus auf Nitrozellulose-Membranfiltern zwecks Gewinnung von Antigen.

Der prakt. Tierarzt 1956: 218 - 221.

101. Mundt, W.

Lyophilisation von Vibrio foetus- und Spirillum suis-Kulturmaterial aus flüssigen Nährböden.

Der prakt. Tierarzt 1956: 6 - 8.

102. Mundt, W.

Das differentialdiagnostische Problem von Vibrionen und Spirillen (V. foetus, V. jejuni und Spirillum suis).

Der prakt. Tierarzt 1956: 190 - 194.

103. Nagel, H. C.

Herd Infection with Vibrio fetus.
Vet. Rec., 64 (1952) : 264 - 265.

104. Nowak, B.

Hodowla Vibrio foetus.
Med. Wet., 11 (1955) : 12 - 15.

105. Olds, D.

Infertility in Cattle.
J. Am. Vet. Med. Ass., 122 (1953):276 - 287.

106. Olson, A.

Spirillkastning.
Scand. Vet. Tidskr. Bakt., Patolog. etc., 1946.

107. Plastridge, W. N.

Cultural and Seriological Observations on Vibrio Fetus.
J. Bact., 42 (1941) : 816 - 817.

108. Plastridge, W. N.

Observations on Vibrio Fetus Infection in Cattle.
J. Am. Vet. Med. Ass., 102 (1943) : 89 - 95.

109. Plastridge, W. N., H. L. Easterbrooks u. L. F. Williams

The Tampon Method of Collection and the Examination of Cervico-vaginal Mucus for Vibrio Fetus Agglutinins.
J. Am. Vet. Med. Ass., 122 (1953) : 516 - 520.

110. Plastridge, W. N., H. L. Easterbrooks, L. F. Williams, E. M. Kiggins u. E. Walker

Reproductive Efficiency and Seriological Findings in Heifers Experimentally Infected with Vibrio Fetus.
Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 493 - 498.

111. Plastridge, W. N., L. F. Williams, H. L. Easterbrooks, E. C. Walker u. R. N. Beccia

Vibriosis in Cattle.

Storrs Agric. Exper. Sta., Bull 281 (1951) : 1.

112. Power, J.H.

Irish Vet. J., 8 (1954) : 238 - 242;
zit. nach E. Mitscherlich u. E. Forschner (92).

113. Price, K.E., L.J. Poelma u. J.E. Faber jr.

Serological and Physiological Relationships Between Strains of Vibrio Fetus.

Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 164 - 169.

114. Prier, J.E.

Vibrionic Abortion.
Vet. Med., 47 (1952) : 85 - 88.

115. Pröger, K.

Beitrag zur Epidemiologie der Vibriosis bei Rindern in Thüringen.

Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 197 - 202 u.
224 - 226.

116. Rasbech, N.O.

Investigations of the Location of Vibrio Fetus Infection in the Reproductive Organs of Bulls.

Rep. 2nd Int. Congr. Physiol. and Path. Anim. Reprod. and Art. Insem., Copenhagen 1952, II: 159.

117. Rasbech, N. O.

zit. nach M. Vandeplassche (163).

118. Rasbech, N. O.

La Vibriose au Danemark.

Bull. Off, Int. Epizoot, 42 (1954) : 608 - 620.

119. Reich, C.V., E.V. Morse u. J.B. Wilson

Gaseous Requirements for Growth of Vibrio Fetus.

Am. J. Vet. Res., 17 (1956) : 140 - 143.

120. Van Rendsburg, S.W.

Vibriosis as a Cause of Herd Infertility in South Africa.
Inl. South Afric. Vet. Med. Ass., 54 (1954) : 25 - 35.

121. Rhoades, H.E.

The Illustration of the Morphology of Vibrio Fetus by Electron Microscopy.

Am. J. Vet. Res., 15 (1954) : 630 - 633.

122. Rikard - Boll, L.F.

Vibriosis in Dairy Cattle in South-West Western Australia.
Austr. Vet. J., 30 (1954) : 41 - 52.

123. Ristic, M., M. Herzberg u. A. Sanders

Colonial and Antigenic Variations of Vibrio Fetus.

Am. J. Vet. Res., 17 (1956) : 803 - 809.

124. Ristic, M. u. E.V. Morse

Experimental Vibrio Fetus Infection in Guinea Pigs; I. Bacteriological Aspects.

Am. J. Vet. Res., 14 (1953) : 399 - 404.

125. Ristic, M., L. Wipf, E. V. Morse u. S. H. McNutt

Experimental Vibrio Fetus Infection in Guinea Pigs; II. Pathological Aspects.

Am. J. Vet. Res., 15 (1954) : 137 - 139.

126. Ristic, M., E. V. Morse, L. Wipf u. S. H. McNutt

Transmission of Experimental Vibrio Fetus Infection Among Guinea Pigs and Hamsters.

Am. J. Vet. Res., 15 (1954) : 309 - 313.

127. Ristic, M., D. A. Sanders u. M. E. Tyler

Vibrio Fetus Infection in Cattle. I. A Comparative Study of the Agglutinin Response in Cervicovaginal Mucus and Blood Serum to Homologous Antigens Following Abortion.

Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 246 - 250.

128. Ristic, M., D. A. Sanders u. F. Young

Experimental Vibrio Fetus Infection in Male Hamsters.
Am. J. Vet. Res., 16 (1955) : 189 - 192.

129. Roberts, S. J.

Mode of Spread of Infection, Controll Measures, and Treatment.
Proc. Book, Am. Vet. Med. Ass., (1952) : 334 - 336.

130. Robinson, E. M., S. W. J. Van Rendsburg, J. S. Van Heerden u. G. C. Van Drimmelen

Isolation of Vibrio Fetus from Bull Semen in

South. Africa..
J. South Afric. Vet. Med. Ass., 27 (1956) : 197 - 200.

131. Rolle, M. u. W. Mundt

Untersuchungen über Vibrio foetus und ähnliche Mikroorganismen.
Zbl. Vet. Med., 1 (1954) : 759 - 772.

132. Rolle, M. u. W. Mundt

Die Züchtung von Vibrio foetus, Spirillum suis und ähnlichen Mikroorganismen.

Zbl. Vet. Med., 2 (1955) : 451 - 458.

133. Rossi, P.

Vibriose bovine.
Cahiers Méd. Vét., 26 (1957) : 65 - 71.

134. Schneider, D. W. u. E. V. Horse

The Growth and Viability of Vibrio Fetus and Related Vibrios in Media Containing Ox Bile.

Cornell Vet., 45 (1955) : 84 - 89.

135. Sjollema, P.

Vibrio Foetus Infection in Cattle and its Influence on Fertility.
Rep. 2nd Int. Congr. Physiol. and Path. Anim. Reprod. and Art. Insem., Copenhagen 1952, III : 35.

136. Smith, Th.

Spirilla Associated with Disease of the Fetal Membranes of Cattle (Infectious Abortion).

J. Exper. Med., 28 (1918) : 701 - 720.

137. Smith, Th.

The Etiological Relation of Spirilla (Vibrio Fetus n. sp.) to Bovine Abortion.

J. Exper. Med., 30 (1919) : 313 - 323.

138. Smith, Th.

Further Studies on the Etiological Significance of Vibrio Fetus.
J. Exper. Med., 37 (1923) : 341 - 356.

139. Smith, Th., R. B. Little u. M. S. Taylor

Further Studies on the Etiological Role of Vibrio Fetus.
J. Exper. Med., 32 (1920) : 683 - 689.

140. Smith, Th. u. M. S. Taylor

Some Morphological and Biological Characters of the Spirilla (Vibrio Fetus n. sp.) Associated with Disease of the Fetal Membranes of Cattle.

J. Exper. Med., 30 (1919) : 299 - 312.

141. Snyman, P. S.

17th Rep. Dir. Vet. Serv. Anim. Industry, 1 (1931) : 197 - 293; zit. nach E. Mitscherlich u. E. Forschner (92).

142. Spiegl, A.

Spirillen als Abortusursache beim Schaf.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 33 (1925) : 118 - 119.

143. Stegenaga, Th.

Vibrio Foetus en Enzootische Steriliteit.

Vet. Diss. Utrecht 1950
u. Tijdschr. Diergeneesk., 75 (1950) : 753 - 763.

144. Stegenga, Th., u. J.I. Terpstra

Over Vibrio fetus-infecties bij het rund en "Enzootische steriliteit".
Tijdschr. Diergeneesk., 74 (1949) : 293 - 296.

145. Steger, G.

Zur Entnahme von Sekretproben aus dem Vaginalraum des Rindes.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 60 (1953); Fortpflzg. u. Bes. der Haustiere, 3 (1953) : 38 - 39.

146. Steger, G.

Beobachtungen zur Vibriosis genitalis beim Rind.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 63 (1956) : Fortpflzg., Zuchthyg. u. Haustier-Bes., 6 (1956) :
37 - 41, 49 - 54, 61 - 65 u. 73 - 77.

147. Stepkowski, S.

Uwagi o rozpoznawaniu wibriozy u bydla.

Med. Wet., 11 (1955) : 129 - 133.

148. Stepkowski, S. u. M. Winiarski

Przypadek ronienia u krowy, wywolany przez Vibrio foetus.
Met. Wet., 10 (1954) : 195 - 196.

149. Stockton, J. J. u. J.P. Newman

The Preservation of Vibrio Fetus by Lyophilisation.

Cornell Vet., 40 (1950) : 377 - 379.

150. Szabo, L.

Infektionspathologiske Problemer i Forbindelse med Afrugtbarhed hos Kvaeget.

Nord. Vet. Med., 3 (1951) : 597 - 608.

151. Szabo, L.

"Tampon-Test-Methodik".
Nature, 168 (1951) : 171.

152. - - -

Bericht der Tagung über die Unfruchtbarkeit des Rindes mit besonderer Berücksichtigung der Genital-Vibriosis, Kopenhagen 6.-11. Dez. 1954

Food and Agriculture Organisation of the United Nations Rom, Feb. 1955.

153. Terpstra, J.I.

La stérilité des bovidés d'origine microbienne.

Bull. Off. Int. Epizoot., 39 (1951) : 1 - 16.

154. Terpstra, J.I.

Schleimproben und Kultur.

Bericht FAO-Tagung, Kopenhagen 1954 (152).

155. Terpstra, J. I.

Vibriose Bovine.

Bull. Off. Int. Epizoot., 42 (1954) : 641 - 648.

156. Terpstra, J.I.

Über die Vibrio-fetus-Infektion beim Rind.

Gastvorlesung an der Tierärztl. Hochschule Hannover, 1955.
zit. nach E. Mitscherlich u. E. Forschner (92).

157. Terpstra, J.I. u. W.A. Eisma

Vibrio Foetus Infection in Cattle and Enzootic Infertility.
Tijdschr. Diergeneesk., 76 (1951) : 433 - 447.

158. Thomsen, A.

Ein durch Spirillen bedingtes infektiöses Verkalben.
Dtsch. tierärztl. Wschr., 28 (1920) : 405 - 407.

159. Thouvenot, H. u. A. Florent

Études d'un anaerobie du sperme du taureau et du vagin de la vache; Vibrio bubulus.

Ann. Inst. Pasteur, 86 (1954) : 237 - 241.

160. Trilenko, P.A.

Vibrionen-Abort beim Rind.

Veterinarija, 30 (1953) : 13.

161. Van Ulsen, F.W.

Infectienze Abortusoorzaken bij het rund.

Tijdschr. Diergeneesk., 77 (1952) : 423 - 427.

162. Vallée, A.

A propos du diagnostic de la vibriose (Vibrio foetus).
Rec. Méd. Vét., 131 (1955) : 91 - 93.

163. Vandeplassche, M.

Die Vibrionen-Infektion des Rindes.

Vortrag an der Vet. med. Fakultät der Justus-Liebig-Hochschule Gießen, 16. Juni 1955.

164. Vandeplassche, M.

Die Pathogenese der Vibrio-fetus-Unfruchtbarkeit bei Färsen.

Vortrag, Fachtagung für künstliche Besamung, Wels/Österr. 24./25. Aug. 1957.

165. Vandeplassche, M., F. Paredis, E. van Niewenhuyse, E. Brone u. A. Florent

Beiträge zur Vibrio-fetus-Infektion bei Rindern mit besonderer Berücksichtigung der Unfruchtbarkeit.
Zbl. Vet. Med., 3 (1956) : 111 - 130.

166. Vincent, R., A. R. Prévot u. H. Thouvenot

Ann. Inst. Pasteur, 83 (1952) : 266 - 268.

167. Vizy, -

Über die biologischen Eigenschaften des Vibrio fetus.
Jahresber. Vet. Med., 62 (1938) : 360.

168. Voigt, A.

Zur Vibriosis genitalis des Rindes.

Arch. Exper. Vet. Med., 9 (1955) : 124 - 135.

169. Voigt, A.

Die Bakteriologie der Deckinfektionen des Rindes mit besonderer Berücksichtigung der Vibriosis genitalis.
Mhefte Vet. Med., 10 (1955) : 210 - 215.

170. Voigt, A.

Über eine kulturelle Methode zur Isolierung von Vibrio fetus aus genitalen Sekreten männlicher und weiblicher Rinder.

ZBl. Bakt., I. Orig., 164 (1955) : 103 - 105.

171. Voigt, A.

Zur Probeentnahme und Behandlung bei der Vibriosis des Rindes.

Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 456 - 459.

172. Ward, B.Q. u. A.M. Lee

Viability of Vibrio Fetus in Petrolatum.

J. Am. Vet. Med. Ass., 112 (1948) : 227 - 228.

173. Van Waveren, G.H.

Direktor, Rijksserum inrichting Rotterdam.

persönl. Mitteilg. 1957 an O. Reg. Vet. Rat Dr. A. Weikl, Bayr. Landesanst. f. Tierseuchenbekämpfung.

174. Webster, H.D. u. F. Thorp jr.

A Study of the Pathology of Embryonating Chicken Eggs Inoculated with Vibrio Fetus.

Am. J. Vet. Res., 14 (1953) : 118 - 122.

175. Weikl, A.

Beitrag zur Vibrioneninfektion des Rindes.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 70 (1957)
136 - 137

176. Weiss, K.

Gedanken über die Vibriosis genitalis.
Der prakt. Tierarzt, 1952: Nr. 7 : 8-11;
Nr. 8: 7-10; Nr. 9 : 3-5 u. Nr. 11: 9-12.

177. Wiidik, R. W. u. G. E. Hlidar

Untersuchungen über die antigene Struktur von Vibrio fetus vom Rind. Das Kapsel- oder K-Antigen von Vibrio fetus.
Zbl. Vet. Med., 2 (1955) : 238 - 250.

178. Wilson, W. R. u. A. McDiarmid

The Occurence of Vibrio Fetus in Aborted Material Received from Cows Inoculated with Strain 19 Brucella Abortus Vaccine.
Vet. Rec., 62 (1950) : 589 - 591.

179. Witte, J.

Spirillen als Ursache des Abortus beim Rinde.
Berl. tierärztl. Wschr., 39 (1923) : 553-555.

180. Wohanka, K.

Kritische Bemerkungen zur Frage der Vibriosis genitalis in Rinder-Besamungsringen Mitteldeutschlands.
Mhefte Vet. Med., 11 (1956) : 101 - 105.

181. Wohanka, K.

Mündl. Mitteilung, Tierärztetag München 1956; zit. nach L. M. Götz (48).

182. Wohanka, K. u. Th. Hubrig

Enzootische Sterilität und Vibriose (Beobachtungen in einer thüringischen Gemeindeherde).
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 69 (1956 : 105-109.

183. Yakimoff, W. L.

Zur Frage der Spirillen beim Abortus des Rindes.
Berl. tierärztl. Wschr., 46 (1930) : 196-197.

184. Zintz, G.

Über das Vorkommen der Vibrionen und Spirillen im Verdauungstraktus bei Tieren.
Vet. Diss. München 1955.

NACHWORT.

Die vorliegende Arbeit konnte mit großzügiger Unterstützung und Förderung durch den Direktor der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung

Herrn Professor Dr. H. Schellner

und unter sachkundiger Beratung und wertvollen Hinweisen für die experimentelle Methodik durch

Herrn Ob. Reg. Vet. Rat Dr. A. Weikl

angefertigt werden.

Beiden von mir hochverehrten Herren fühle ich mich zu großem Dank verpflichtet für die Einführung in eigene wissenschaftliche Arbeit und die mir gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 25. Mai 1930 wurde ich, Jürgen Bertram Kayser, als Sohn des Dr. Ing. Hans-Georg Kayser, jetzigen o. Professors mit dem Lehrstuhl für Brennstofftechnik an der Technischen Universität Berlin, und seiner Ehefrau Eva, geb. Sender, in Dresden geboren.

Von Ostern 1936 bis zum Herbst 1937 besuchte ich die Volksschule in Berlin-Lichterfelde-West und anschließend bis Ostern 1940 die Volksschule in Altenburg/Thüringen. Dann wurde ich dort in die Staatl. Oberschule für Jungen aufgenommen, an der ich bis zum Juni 1947 verblieb.

Vom Juli 1947 bis zum April 1949 machte ich an der Staats-Domäne Brüggefeld/Weser eine landwirtschaftliche Lehrzeit durch, die ich mit der Landwirtschaftsgehilfen-Prüfung abschloß.

Von Ostern 1949 bis zum Herbst 1950 besuchte ich das Städt. Realgymnasium "Ziehen-Schule" in Frankfurt-Main-Eschersheim und wechselte dann wegen eines Auslandsaufenthaltes meiner Eltern in ein Landerziehungsheim, die Odenwaldschule in Oberhambach/Bergstraße über, wo ich im Februar 195 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1952 an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, an der ich im Mai 1957 die Tierärztliche Prüfung bestand.

Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation nahm ich im Juni 1957 in der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung auf. Vom Februar bis zum Juli 1958 war ich an der Anstalt als wissenschaftliche Hilfskraft beschäftigt.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATUR 4

A. Allgemeines 4

B. Spezieller Teil 7

1. Die in den Genitalorganen von Rindern vorkommenden verschiedenen Vibrionen-Arten 7

2. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale von weiblichen Rindern 11

a) Lokalisation 11
b) Häufigkeit 13

3. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen im Genitale von männlichen Rindern 14
a) Lokalisation 14
b) Häufigkeit 16

4. Lokalisation und Häufigkeit von Vibrionen in bovinem Abortus-Material 19

a) Lokalisation 19
b) Häufigkeit 20

5. Gewinnung und Verarbeitung von Untersuchungsmaterial zum mikroskopischen und kulturellen Nachweis von Vibrionen 25

a) Material von weiblichen Rindern 25
b) Material von Bullen 32
c) Abortus-Material 39

Seite

6. Nachweis der Vibrio-fetus-Infektion mit Hilfe von Färsen und kleinen Versuchstieren 42

a) Ermittlung vibrio-fetus-infizierter Bullen mit Hilfe von Versuchs-Färsen 42
b) Brauchbarkeit kleiner Versuchstiere zum Nachweis von Vibrio fetus 46

7. Morphologie und Beweglichkeit von Vibrio fetus 52

Beweglichkeit 59
Vibrio fetus im Infektionsmaterial 60

8. Färbbarkeit von Vibrio fetus; Färbe-Methoden 60

9. Kultivierung von Vibrio fetus 65

a) Temperatur-Optimum 65
b) Optimale Wachstums-Atmosphäre 66
c) Optimaler pH-Wert (pH-Puffer) 68
d) Optimale Agar-Konzentration 71
e) Flüssige Nährmedien 72
f) Halbflüssige und halbfeste Nährmedien 76
g) Feste Nährmedien 81
h) Brutei-Kulturen 87
i) Reinzüchtung von Vibrio fetus; Selektiv-Medien 88
k) Wachstumsformen von Vibrio fetus und apathogenen Vibrionen auf festen Nährmedien 95
l) Dissoziation von Vibrio fetus 100
m) Aufbewahrung und Haltbarkeit von Vibrio fetus-Kulturen; Lyophilisierung 105

Seite

10. Biochemisches Verhalten von Vibrio fetus 107

11. Differenzierung der in den Genitalorganen von Rindern sowie in bovinem Abortus-Material vorkommenden Vibrionen 113

12. Widerstandsfähigkeit von Vibrio fetus außerhalb des lebenden Organismus 118

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 122

A. Material und Methoden 122

1. Untersuchungsmaterial 122

a) Von Aborten bei Rindern stammendes Material 122
b) Von geschlachteten Kühen stammendes Material 123
c) Von Bullen stammendes Material 123

2. Gewinnung und Anzüchtung des Untersuchungsmaterial 124

a) Von Aborten bei Rindern stammendes Material 124
b) Von geschlachteten Kühen stammendes Material 126
c) Von Bullen stammendes Material 127

3. Nährmedien 131

a) Flüssiges Nährmedium 131
b) Halbflüssiges und halbfestes Nährmedium 132
c) Feste Nährmedien 133
d) Selektiv-Medien 135

4. Untersuchung der bebrüteten Kulturen auf das Wachstum von Vibrionen 138

Seite

a) Untersuchung des Keim-Wachstums in halbfesten Medien 138
b) Untersuchung des Keim-Wachstums auf festen Nährmedien 140

5. Isolierung der Vibrionen aus verunreinigten Kulturen 140

6. Biochemische Untersuchung der isolierten Vibrionen und verschiedener Vibrionen-Laboratoriums-Stämme 142

7. Serologische Untersuchung der isolierten Vibrionen und verschiedener Vibrionen-Laboratoriums-Stämme 147

a) Antigen-Gewinnung 148
b) Gewinnung von Cervico-Vaginalschleim von vibrio-fetus-infizierten Kühen 148
c) Durchführung des Röhrchen-Agglutinations-Test 149

B. Untersuchungs-Ergebnisse 149

1. Abortus-Material 149

Häufigkeit des Vibrionen-Nachweises an abortierten Feten und ihren Secundinae 151

Häufigkeit des Vibrionen-Nachweises an den verschiedenen Organen der abortierten Feten 152

Gleichzeitige Ermittlung von als Abortus-Erreger beim Rind bekannten Keimen neben Vibrionen 155

Vibrionen-Nachweis bei Früh- und Spätaborten 156

Seite

Vibrionen-Nachweis der mumifizierten Feten 156

Pathologisch-anatomische Befunde bei vibrio-positiven Feten und Secundinae 156

Reinzüchtung der ermittelten Vibrionen 158

Zeit zwischen Abort und Anzüchtung des Untersuchungsmaterials 159

2. Vom Schlachthof stammendes Material 159

Vibrionen-Nachweis in aus verschiedenen Stadien normaler Trächtigkeit stammenden Feten 160

Häufigkeit des Vibrionen-Nachweises in den verschiedenen Organen normaler Feten einschließlich der Secundinae und des Fruchtwassers 161

Reinzüchtung der ermittelten Vibrionen 161

3. Präputial-Spülproben und Sperma von Bullen 162

Material von den Bullen aus Station "A." 163
Material von den Bullen aus Station "B." 165
Material von den Bullen aus Station "C." 166

Häufigkeit des gleichzeitigen Nachweises von Vibrionen in Präputial-Spülproben und Sperma 168

Zeit zwischen Entnahme und Anzüchtung der Proben 169

Verarbeitung der Präputial-Spülproben zur Anzüchtung nach verschiedenen Methoden 170

Reinzüchtung der ermittelten Vibrionen 170

Seite

4. Eignung verschiedener fester Nährmedien für die Anzüchtung von Untersuchungsmaterial zum Nachweis von Vibrionen 170

Übersicht über die auf ihr kulturelles, biochemisches und serologisches Verhalten untersuchten Vibrionen-Stämme 172

5. Kulturelles Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme 175

a) in flüssigem und halbflüssigem Nährmedium 175
b) in halbfestem Nährmedium 180
c) auf festen Nährmedien 181

6. Biochemisches Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme 185

7. Verhalten der isolierten Vibrionen-Stämme gegenüber dem Vaginalschleim vibrio-fetus-infizierter Rinder im Röhrchen-Agglutinations-Test 188

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 189

Zusammenfassung 196

V. LITERATUR - VERZEICHNIS 198

Nachwort 227

Lebenslauf 228

ANHANG

Tabelle IIa : Untersuchung von abortierten Feten auf das Vorkommen von Vibrionen (Gruppe I)
Tabelle IIb : Untersuchung von abortierten Feten auf das Vorkommen von Vibrionen (Gruppe II)

Tabelle III : Vorkommen von Vibrionen in abortierten Feten (vibrio-positive Fälle aus Gruppe I)
Tabelle V : Vorkommen von Vibrionen und Spirillen in normalen (nichtabortierten) Feten
Tabelle VI : Untersuchung von Präputialspülproben und Sperma der Bullen aus Station "A" auf Vibr.
Tabelle VII: Untersuchung von Präputialspülproben und Sperma der Bullen aus Station "B" auf Vibr.
Tabelle VIII: Untersuchung von Präputialspülproben der Bullen aus Station "C" auf Vibrionen

Die Tabellen I, IV, IX und X finden sich im Text auf den Seiten 129, 138, 146 und 164.

TABELLE IIa: UNTERSUCHUNG VON ABORTIERTEN FÖTEN AUF DAS VORKOMMEN VON VIBRIONEN

NR.	DAT. ANL.	DAT. ABL.	HERZ 1	HERZ 2	LUNGE 1	LUNGE 2	LEBER 1	LEBER 2	NIERE 1	NIERE 2	MILZ 1	MILZ 2	MAGEN 1	MAGEN 2	DARM 1	DARM 2	GEHIRN 1	GEHIRN 2	EIHAUT 1	EIHAUT 2	SONST. ORGANE 1	SONST. ORGANE 2	FOETUS ALTER in MON.	FOETUS ZUSTAND	SONSTIGE KEIME*	BEMERKUNGEN
541	4.6.57	7.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	×	×	7	gut	Br. abortus	/
542	6.6.57	8.6.57	+	—	+	—	++	++	+	+	+	—	++	+	+	+	++	+	×	×	×	×	5	beginnende Mazerifikation	/	Abort 25 Tage nach MKS-Impfung
553	6.6.57	10.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	4	gut	E. coli	/
570	11.6.57	14.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	4	gut	Br. abortus	/
575	11.6.57	14.6.57	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	—	—	×	×	×	×	6	starke Mazerifikation	/	/
584	13.6.57	16.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	—	++	—	—	—	×	×	×	×	4½	sehr gut	Br. abortus	/
587	14.6.57	17.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	++	—	—	—	++	—	×	×	×	×	8½	sehr gut	/	/
606	21.6.57	24.6.57	+	+	+	+	++	+	—	—	++	—	++	—	—	—	++	—	×	×	×	×	8	sehr gut	/	/
623	22.6.57	25.6.57	++	++	—	—	—	—	×	×	×	×	++	++	—	—	+	+	++	++	×	×	3	mäßig, z.T. angefault an d. Extremitäten	Streptokokken	/
625	24.6.57	28.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	×	×	7	sehr gut	Br. abortus	bisher nahezu Coli-Aborte
633	25.6.57	28.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	3	sehr gut	/	/
637	27.6.57	30.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	3	mittelgradige Mazerifikation	Streptokokken	mehrere Aborte im 3.–4. Monat
650	29.6.57	2.7.57	—	—	++	++	—	—	++	++	—	—	++	—	++	+	—	—	++	++	×	×	4½	gut	/	Vibrionen mikroskop. in Eihaut
658	1.7.57	4.7.57	++	—	++	—	—	—	++	++	—	—	++	++	—	—	—	—	++	++	FRUCHTWASSER ++	FRUCHTWASSER ++	3	gut	/	/
660	1.7.57	4.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	×	×	8	gut	E. coli	Kalb hat 2 Tage gelebt
663	2.7.57	5.7.57	—	—	—	—	—	—	×	×	×	×	—	—	×	×	—	—	—	—	HÖRNERHÖHLEN —	HÖRNERHÖHLEN —	3½	totale Mazerifikation	/	/
670	4.7.57	8.7.57	++	++	—	—	++	+	+	—	—	—	++	+	—	—	+	+	×	×	×	×	4	mäßig gut	Diplokokken	Abort 28 Tage nach MKS-Impfung
674	5.7.57	8.7.57	++	—	++	++	+	—	—	—	—	—	++	+	+	—	++	++	×	×	×	×	4	gut	/	/
685	10.7.57	13.7.57	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	++	—	++	++	—	—	×	×	×	×	5½	mäßig gut	Streptokokken	/
690	12.7.57	15.7.57	++	+	—	—	+	—	—	—	—	—	++	+	++	—	+	+	×	×	×	×	6	gut, Kopf angefressen	/	/
692	13.7.57	16.7.57	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	++	++	+	—	—	—	×	×	×	×	8	gut	/	/
693	13.7.57	16.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	7	mäßig, Glieder angef.	/	/
699	15.7.57	18.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	6	mäßig gut	Br. abortus	/
708	16.7.57	19.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	3	mäßig	/	/
715	19.7.57	22.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	5	sehr gut	/	/
724	20.7.57	23.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	5	beginnende Mazerifikation	/	/
726	20.7.57	23.7.57	++	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	++	++	—	—	+	+	×	×	6	sehr gut	/	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut
728	22.7.57	25.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	5	gut	/	1 Vibrio-Kol. direkt angelegt auf schiefer Eihaut-gallen-Nährlage
740	24.7.57	27.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	7½	mäßig gut	/	/
741	24.7.57	27.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	6	mäßig	Schimmelpilze	/
747	25.7.57	28.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	8½	sehr gut	/	/
748	25.7.57	28.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	×	×	—	—	++	++	ØFOETUS ++	ØFOETUS ++	6	totale Mazerifikation	/	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
750	26.7.57	29.7.57	—	—	—	—	++	+	+	—	+	—	++	+	+	—	++	+	++	+	×	×	4	starke Mazerifikation	/	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
751	26.7.57	29.7.57	++	+	+	—	+	—	+	+	+	—	++	++	++	++	+	—	—	—	×	×	8½	sehr gut	/	/
754	26.7.57	29.7.57	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	++	++	+	—	++	—	×	×	×	×	6½	beginnende Mazerifikation	/	/
757	27.7.57	30.7.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	8½	sehr gut	Corynebact. pyogenes	/
774	1.8.57	5.8.57	—	—	—	—	++	+	++	—	—	—	++	+	++	+	++	+	×	×	×	×	6	beginnende Mazerifikation	E. coli	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
784	2.8.57	5.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	×	×	4	starke Mazerifikation	E. coli + Streptokokken	/
787	3.8.57	6.8.57	—	—	++	+	+	—	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	×	×	×	×	6½	fortgeschrittene Zersetzung	/	/
788	3.8.57	6.8.57	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	×	×	7	gut	Streptokokken	/
793	6.8.57	9.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	5½	starke Mazerifikation	/	/
811	12.8.57	15.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	×	×	7	mittelgradige Mazerifikation	E. coli + Staphylokokken	/
819	14.8.57	17.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	++	+	×	×	6	beginnende Mazerifikation	Schimmelpilze	/
820	14.8.57	17.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	—	—	++	+	×	×	4½	beginnende Mazerifikation	E. coli	/
825	16.8.57	18.8.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	×	×	×	×	5	mäßig	/	beginnende Konzeptionsreife im Zerfall

ZEICHENERKLÄRUNG: + = Vibrionen nachgewiesen; — = keine Vibrionen nachweisbar; × = Organ nicht untersucht; * = sonstige mikroskopisch-kulturelle Diagnose

TABELLE IIb

UNTERSUCHUNG VON ABORTIERTEN FÖTEN AUF DAS VORKOMMEN VON VIBRIONEN

NR.	DAT. ANL.	DAT. ABL.	FRUCHTWASSER 1	FRUCHTWASSER 2	EIHAUT 1	EIHAUT 2	Ø FOETUS 1	Ø FOETUS 2	BAUCHHÖHLE 1	BAUCHHÖHLE 2	LEBER 1	LEBER 2	GEHIRN 1	GEHIRN 2	FOETUS ALTER	FOETUS ZUSTAND	SONSTIGE KEIME *	BEMERKUNGEN
T 218	6.6.57	10.6.57	—	—	+	+	—	—	—	—	X	X	X	X	ca. 5 Wochen	mäßig gut	Streptokokken u. gram+ Stäbch.	⁄
T 219	7.6.57	11.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	X	X	X	X	ca. 4 Wochen	mäßig gut	⁄	⁄
T 227	11.6.57	14.6.57	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	—	—	ca. 8 Wochen	mäßig gut	⁄	3 Aborte in Bang-neg. B.
572	11.6.57	14.6.57	—	—	—	—	++	+	++	++	+	+	++	+	ca. 3½ Monate	mäßig gut	⁄	⁄
582	12.6.57	15.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ca. 4 Monate	totale Mazerifikation	⁄	soll nach Vorb. 7 Mon. alt sein
T 229	14.6.57	18.6.57	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ca. 3½ Monate	beginnende Mazerifikation	⁄	Zwillinge
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			⁄	
T 234	21.6.57	24.6.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ca. 8 Wochen	beginnende Mazerifikation	⁄	⁄
T 255	9.7.57	12.7.57	+	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	ca. 2½ Monate	sehr gut	⁄	Zwillinge
			++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++			⁄	
T 297	5.8.57	8.8.57	++	+	++	+	++	++	++	+	++	+	++	++	ca. 2½ Monate	beginnende Mazerifikation	E. coli	⁄
812	12.8.57	15.8.57	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ca. 8 Wochen	gut	⁄	⁄
Röhrchen positiv °			5	5	7	6	6	6	6	6	6	6	5	5				
ORGAN POSITIV °			4 ×		6 ×		5 ×		5 ×		5 ×		4 ×					
Röhrchen negativ °			4	4	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3				
ORGAN NEGATIV °			3 ×		1 ×		2 ×		2 ×		1 ×		2 ×					
ORG. NICHT UNTERS. °			⁄		⁄		⁄		⁄		1 ×		1 ×					
ORGAN ANTEILIG POSITIV °			57.1%		85.7%		71.4%		71.4%		83.3%		66.7%					

ZEICHENERKLÄRUNG:

+ = Vibrionen nachgewiesen

— = keine Vibrionen nachweisbar

X = Organ nicht untersucht

* = sonstige mikroskopisch-kulturelle Diagnose

° Hierbei sind nur die Fälle (Nm) berücksichtigt, in denen zumindest in einem Organ des betr. Foetus Vibrionen nachgewiesen werden konnten.

TABELLE III: VORKOMMEN VON VIBRIONEN IN ABORTIERTEN FÖTEN

NR.	DAT. ANL.	DAT. ABL.	HERZ 1	HERZ 2	LUNGE 1	LUNGE 2	LEBER 1	LEBER 2	NIERE 1	NIERE 2	MILZ 1	MILZ 2	MAGEN 1	MAGEN 2	DARM 1	DARM 2	GEHIRN 1	GEHIRN 2	EIHAUT 1	EIHAUT 2	SONST ORGANE		FOETUS ALTER in MÖN.	FOETUS ZUSTAND	SONSTIGE KEIME*	BEMERKUNGEN
542	5.6.57	8.6.57	+	−	+	−	++	++	+	+	+	−	++	+	+	+	++	+	×	×	×	×	5	beginnende Mumifikation	∴	Abort 15 Tage nach MKS-Impfung
575	11.6.57	14.6.57	++	++	−	−	−	−	−	−	−	−	++	+	−	−	−	−	×	×	×	×	6	starke Mumifikation	∴	
584	13.6.57	16.6.57	−	−	−	−	−	−	−	−	++	++	++	−	++	−	−	−	×	×	×	×	4½	sehr gut	Br. abortus	∴
587	14.6.57	17.6.57	−	−	−	−	−	−	−	−	++	−	++	−	−	−	++	−	×	×	×	×	8½	sehr gut	∴	∴
606	21.6.57	24.6.57	+	+	+	+	++	+	−	−	++	−	++	−	−	−	++	−	×	×	×	×	8	sehr gut	∴	∴
623	22.6.57	25.6.57	++	++	−	−	−	−	×	×	×	×	++	++	−	−	+	+	++	++	×	×	3	mäßig, 2 Tage gefressen à Zerfressen	Streptokokken	∴
650	29.6.57	2.7.57	−	−	++	++	−	−	++	++	−	−	++	−	++	+	−	−	++	++	×	×	4½	gut	∴	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut
658	1.7.57	4.7.57	++	−	++	−	−	−	++	++	−	−	++	++	−	−	−	−	++	++	FRUCHTWASSER ++	++	3	gut	∴	∴
670	4.7.57	8.7.57	++	++	−	−	++	+	+	−	−	−	++	+	−	−	++	+	×	×	×	×	4	mäßig gut	Diplokokken	Abort 10 Tage nach MKS-Impfung
674	5.7.57	8.7.57	++	−	++	++	+	−	−	−	−	−	++	+	+	−	++	++	×	×	×	×	4	gut	∴	∴
685	10.7.57	13.7.57	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	++	−	++	++	−	−	×	×	×	×	5½	mäßig gut	Streptokokken	∴
690	12.7.57	15.7.57	++	+	−	−	+	−	−	−	−	−	++	+	++	−	+	+	×	×	×	×	6	gut. Kopf angefressen	∴	∴
692	17.7.57	16.7.57	−	−	−	−	−	−	++	+	−	−	++	++	+	−	−	−	×	×	×	×	8	gut	∴	∴
726	20.7.57	23.7.57	++	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	++	++	−	−	+	+	×	×	6	sehr gut	∴	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut
748	25.7.57	28.7.57	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	++	+	×	×	−	−	++	++	ØFORTUS ++	++	6	totale Mumifikation	∴	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
750	26.7.57	29.7.57	−	−	−	−	++	+	+	−	+	−	++	+	+	−	++	+	++	+	×	×	4	starke Mumifikation	∴	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
751	26.7.57	29.7.57	++	+	+	−	+	−	+	+	+	−	++	++	++	++	+	−	−	−	×	×	8½	sehr gut	∴	∴
754	26.7.57	29.7.57	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	++	++	+	−	++	−	×	×	×	×	6½	beginnende Mumifikation	∴	∴
774	1.8.57	5.8.57	−	−	−	−	−	+	+	++	−	−	++	+	++	+	++	+	×	×	×	×	6	beginnende Mumifikation	E. coli	Vibrionen mikroskopisch in Eihaut + Magen
784	2.8.57	5.8.57	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	++	−	×	×	4	starke Mumifikation	E. coli + Streptokokken	∴
787	3.8.57	6.8.57	−	−	++	+	+	−	+	−	−	−	++	++	++	+	++	++	×	×	×	×	6½	fortgeschrittene Zersetzung	∴	∴
788	3.8.57	6.8.57	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	×	×	7	gut	Streptokokken	∴
819	14.8.57	17.8.57	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	++	+	×	×	6	beginnende Mumifikation	Schimmelpilze	∴
820	14.8.57	17.8.57	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	++	+	−	−	−	−	++	+	×	×	4½	beginnende Mumifikation	E. coli	∴
825	15.8.57	18.8.57	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	×	×	×	×	5	mäßig	∴	schwankende Hungertiere als Bestand
Rohrchen positiv			10	7	8	4	10	5	12	6	7	1	23	16	15	8	12	8	9	8						
ORGAN POSITIV			10×		8×		10×		12×		7×		23×		15×		12×		9×							
ORGAN NEGATIV			15×		17×		15×		12×		17×		2×		9×		13×		2×							
ORG. NICHT UNTERS.			∴		∴		∴		1×		1×		∴		1×		∴		14×							
ORGAN ANTEILIG POSITIV°			40.0%		32.0%		40.0%		50.0% (48-52%)		29.2% (28-32%)		92.0%		62.5% (60-64%)		48.0%		81.8%							

° bezogen auf die Gesamtzahl der vibrio-positiven Föten

ZEICHENERKLÄRUNG:

+ = Vibrionen nachgewiesen

− = keine Vibrionen nachweisbar

× = Organ nicht untersucht

* = sonstige mikroskopisch-kulturelle Diagnose

TABELLE I VORKOMMEN VON VIBRIONEN UND SPIRILLEN IN NORMALEN (NICHTABORTIERTEN) FÖTEN

NR.	ALTER FOETUS	BEFUND
S 7	7. Monat	DARM: vorwiegend K, wenig M, vereinzelt L; ++ xxx
S10	5. Monat	FRUCHTWASSER: KML; ++ xxx
S 11	7 Monat	LUNGE: KM; ++ xx — LEBER: KM; ++ xxx — MAGEN: KM; ++ xxx
S 12	5. Monat	LUNGE: KM; + x — NIERE: K; ++ xx — DARM: K; ++ xxx
S 13	7. Monat	EIHAUT: vorwiegend K, wenig M; + xx
S 14	7. Monat	FRUCHTWASSER: vorwiegend K, wenig M, ++ xxx
S 15	8. Monat	LUNGE: KML; ++ xxx — EIHAUT: KM; + xx
S 17	6. Monat	MAGEN: K; + xx
S 19	5. Monat	FRUCHTWASSER: KML; + xx
S 22	6. Monat	HERZ: KML; ++ xxx — FRUCHTWASSER: vorwiegend K, wenig M, einzelne L, ++ xxx
S 23	5. Monat	MAGEN: K; ++ xxx
S 25	6. Monat	HERZ: KML; ++ xxx
S 32	8. Monat	FRUCHTWASSER: KML; ++ xxx
S 37	7. Monat	FRUCHTWASSER: KML; ++ xxx
S 38	7. Monat	FRUCHTWASSER: KM (relativ dick); + xx
S 40	6. Monat	MILZ: KML (relativ dick); ++ xx — DARM: KML (relativ dick); + xxx — FRUCHTWASSER: K, einzelne M; ++ xxx
S 41	6. Monat	EIHAUT: KML; ++ xx — FRUCHTWASSER: KM; + x
S 43	7. Monat	EIHAUT: KML; ++ xxx — FRUCHTWASSER: KML; + x
S 47	9. Monat	GEHIRN: KML; + xx — MAGEN: KML; ++ xx — EIHAUT: KM; ++ xxx
S 50	5. Monat	FRUCHTWASSER: vorwiegend K, wenig M; + xx

ZEICHENERKLÄRUNG:

+ = Wachstum der Vibrinen bzw. der Spirillen in der Primärkultur
x = Beweglichkeit - " " " " " "

K = Komma- oder Bumerang-Formen
M = S-Formen und Formen mit 3-4 Windungen
L = spiralige und faserartige Formen

TABELLE VI: UNTERSUCHUNG VON PRÄPUTIALSPÜLPROBEN UND SPERMA DER BULLEN AUS STATION "A." AUF VIBRIONEN

LFD.NR.	BULLE	PRÄPUTIAL-PROBE THIOL-MEDIUM (halbfest) 1	PRÄPUTIAL-PROBE THIOL-MEDIUM (halbfest) 2	SPERMA THIOL-MEDIUM (halbfest) 1	SPERMA THIOL-MEDIUM (halbfest) 2	SUBKULTUREN auf BRILL-GRÜN-BLUT-AGAR	SUBKULTUREN auf BLUT-AGAR	SUBKULTUREN auf SCHOKOLADE-BLUT-AGAR
1	ÄLPI	—	—	×	×	×	×	×
2	ATTILA	—	—	++	+	++	+	+
3	BALDUR	—	—	++	+	+	(++)	(+)
4	BALDWIN	—	—	+	+	+++	—	—
5	BENITO	—	—	+++	++	+++	++	++
6	DIPLOMAT	—	—	++	++	++	++	+
7	DRALL	—	—	—	—	×	×	×
8	GONDART	++	+	+++	+	+++	+	++
9	GRAF	+	+	+	+	++	+	(++)
10	HARRAS	—	—	+	+	+	++	++
11	HELLER	—	—	—	—	×	×	×
12	JALL	++	+	+++	+++	++	+	+
13	MAJOR	—	—	—	—	×	×	×
14	MAMBO	—	—	++	++	+	+	++
15	MEISTER	+	+	++	+	+	—	—
16	MOLCH	—	—	—	—	×	×	×
17	NIKO	++	+	++	++	+++	++	+++
18	PANTHER	—	—	—	—	×	×	×
19	PILOT	—	—	—	—	×	×	×
20	PIUS	—	—	++	+	+	(+)	++
21	PLANET	—	—	—	—	×	×	×
22	POLLUX	—	—	++	+	++	++	+
23	PONNY	—	—	—	—	×	×	×
24	PUNKER	—	—	+	+	+	—	(+)
25	RALF	—	—	—	—	×	×	×
26	ROLAND	—	—	++	—	(+)	+	++
27	THEO	—	—	++	+	+++	++	+
28	WACKER	—	—	—	—	×	×	×
29	WELFER	+	+	—	—	—	(+)	+
30	WERNER	—	—	—	—	×	×	×
RÖHRCHEN POSITIV		6	6	17	16	16×	12×	13×
RÖHRCHEN NEGATIV		24	24	12	13	1×	3×	3×
PROBE POSITIV		6×(=20%)		17×(=56.7%)		1×	3×	2×

ZEICHENERKLÄRUNG:

+ = Vibrionen
≠ = Verunreinigungs-Keime
× = Kultur nicht angelegt

VIBRIO-EINZELKOLONIE
VIBRIONEN NUR IM ÜBERSICHTS-PRÄPARAT
VIBRIO-NEGATIV

TABELLE VII: UNTERSUCHUNG VON PRÄPUTIALSPÜLPROBEN UND SPERMA DER BULLEN AUS STATION "B." AUF VIBRIONEN

LFD. NR.	BULLE	PRÄPUTIAL-SPÜLPROBE THIOL-MEDIUM (halbf.) 1 ✦	2 ✦	THIOL-MEDIUM (halbf.) 1 •	2 •	SPERMA THIOL-MEDIUM (halbf.) 1	2	PRÄPUTIAL-SPÜLPROBE auf BRILL.-GRÜN-BLUT-AGAR	BLUT-AGAR	SCHOKOLADE-BLUT-AGAR	SUBKULTUR von vibrio-pos Thiol-Kultur in THIOL-MED.
1	ANDY	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
2	BAGGER	+ ≠	(+) ≠	(+) ≠	— ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	(+) ≠	+ ≠	++ ≠
3	BERTO	++ ≠	+ ≠	+ ≠	(+) ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	+ ≠	+ ≠	++ ≠
4	FARUK	+ ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	(+) ≠	— ≠	++ ≠
5	HABICHT	++ ≠	(+) ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	(+) ≠	(+) ≠
6	HEKTOR	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
7	HILMAR	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
8	HOBBY	+ ≠	+ ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	++ ≠
9	HOLM	+ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	+ ≠	+ ≠	++ ≠
10	KERL	++ ≠	+ ≠	+ ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	+ ≠	(+) ≠	++ ≠
11	MARSCHALL	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
12	MASTER	+ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	+ ≠	— ≠	++ ≠
13	NEPTUN	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
14	PAMIR	++ ≠	+ ≠	(+) ≠	— ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	(+) ≠	— ≠	++ ≠
15	PIRAT	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	— ≠	×
15	PRÄSIDENT	++ ≠	+ ≠	+ ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	— ≠	+ ≠	++ ≠
17	PRONTO	++ ≠	— ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	(+) ≠	+ ≠	++ ≠
18	REX	++ ≠	++ ≠	++ ≠	— ≠	— ≠	— ≠	++ ≠	++ ≠	++ ≠	++ ≠
19	SENAT	++ ≠	+ ≠	+ ≠	(+) ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	+ ≠	— ≠	++ ≠
20	SIEGER	++ ≠	+ ≠	+ ≠	+ ≠	— ≠	— ≠	+ ≠	— ≠	(+) ≠	++ ≠
RÖHRCHEN POSITIV		14	11	10	5	0	0	13×	6×	6×	VIBRIO-EINZELKOLONIE
RÖHRCHEN NEGATIV		6	9	10	15	20	20	—	4×	3×	VIBRIONEN NUR IM ÜBERSICHTS-PRÄPARAT
PROBE POSITIV		14× (=70%)		10× (=50%)		keine		1×	4×	5×	VIBRIO-NEGATIV°

ZEICHENERKLÄRUNG: + = Vibrionen
≠ = Verunreinigungs-Keime
× = Kultur nicht angelegt
Kulturen angelegt ✦ nach Methode I, • " " II (siehe Text!)

° vibrio-negativ in vibrio-positiven Fällen (Nr.)

TABELLE VIII: UNTERSUCHUNG VON PRÄPUTIALSPÜLPROBEN DER BULLEN AUS STATION "C." AUF VIBRIONEN

LFD.NR.	BULLE	PRÄPUTIAL-SPÜLPROBE in THIOL-MEDIUM (halbf.) 1 ✦	2 ✦	1 •	2 •	PRÄPUTIAL-SPÜLPROBE auf BRILL.-GRÜN-BLUT-AGAR	BLUT-AGAR 17%	SCHOKOLADE-BLUT-AGAR 17%	BLUT-AGAR	SCHOKOLADE-BLUT-AGAR
1	BISMARCK	++ ///	++ ///	++ ///	+ ///	— /	— ///	— ///	— ///	— /
2	HEIMO	++ ///	+ ///	+ ///	— ///	— /	— ///	— ///	— ///	— ///
3	HOLLER	++ ///	+ ///	+ ///	— ///	+ /	+ ///	— ///	— ///	+ ///
4	KURIER	++ ///	+ ///	+ ///	— ///	— ///	(+) ///	+ ///	(+) ///	— ///
5	MAURER	++ ///	++ ///	+ ///	+ ///	++ /	+ ///	++ /	++ ///	+ ///
6	PASCHA	— ///	— ///	+ ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///
7	ROBIN	++ ///	++ ///	++ ///	+ ///	++ /	— ///	+ ///	+ ///	— ///
8	SATURN	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///	— ///
RÖHRCHEN POSITIV		6	6	7	3	3×	2×	3×	2×	2×
RÖHRCHEN NEGATIV		2	2	1	5	—	1×	—	1×	—
PROBE POSITIV		6× (=75,0%)		7× (=87,5%)		4×	4×	4×	4×	5×

SUBKULTUREN von vibrio-pos. Thiol-Kultur						
	BISMARCK	++ ///	+ ///	+ ///	++ ///	+ ///
	HEIMO	+ ///	(++) ///	— ///	(+) ///	(++) ///
		2×	1×	1×	1×	1×
		—	1×	—	1×	1×
		—	—	1×	—	—

ZEICHENERKLÄRUNG.

+ = Vibrionen
/ = Verunreinigungs-Keime

Kulturen angelegt
✦ nach Methode I
• " " II
(siehe Text!)

VIBRIO-EINZELKOLONIE
VIBRIONEN NUR IM ÜBERSICHTS-PRÄPARAT
VIBRIO-NEGATIV °

° vibrio-negativ in vibrio-positiven Fällen